



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**KOMBINACE HYALURONANU A KOLAGENU V
MEDICÍNSKÝCH PŘÍPRAVCÍCH**

THE COMBINATION OF HYALURONAN AND COLLAGEN IN MEDICAL PRODUCTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Hana Vaculíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1165/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Hana Vaculíková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Kombinace hyaluronanu a kolagenu v medicínských přípravcích

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat literární rešerši na dané téma.
2. Navrhnout experimenty zkoumající vliv koncentrace a teploty na hustotu a ultrazvukovou rychlost roztoků kolagenu.
3. Vyhodnocení dat.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Hana Vaculíková
student(ka)

Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

V této práci byla zkoumána hustota a ultrazvuková rychlost roztoků kolagenu v ultra čisté deionizované vodě a roztoků kolagenu s hyaluronanem v ultra čisté deionizované vodě. Hustota byla měřena denzitometricky při různých teplotách a ultrazvuková rychlost pomocí ultrazvukové spektrometrie s vysokým rozlišením při teplotě 25°C.

Klíčová slova

Kolagen, kyselina hyaluronová, denzitometrie, ultrazvuková spektrometrie s vysokým rozlišením, kolagenový gel

Abstract

In this work there were examined density and ultrasonic velocity of collagen solutions in ultra pure deionized water and solutions of collagen with hyaluronan in ultra pure deionized water. Density was measured by densitometry at different temperatures and ultrasonic velocity using an ultrasonic high-resolution spectrometry at a constant temperature 25 ° C.

Key words

Collagen, hyaluronic acid, densitometry, ultrasonic high-resolution spectrometry, collagen gel

Citace

VACULÍKOVÁ, H. *Kombinace hyaluronanu a kolagenu v medicínských přípravcích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 44 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Andrea Kargerová, PhD..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

Podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Andrei Kargerové, PhD. za ochotu, trpělivost a pomoc při měření, bez níž by tato práce nemohla vzniknout. Dále bych ráda poděkovala své rodině, přátelům a blízkým za podporu při studiu.

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Kolagen.....	8
2.1.1	Charakteristika kolagenu	8
2.1.2	Struktura kolagenu	8
2.1.3	Typy kolagenu.....	10
2.1.4	Syntéza a rozpad kolagenu	10
2.1.5	Využití kolagenu	12
2.2	Kyselina hyaluronová	13
2.2.1	Charakteristika kyseliny hyaluronové	13
2.2.2	Výskyt kyseliny hyaluronové	13
2.2.3	Struktura kyseliny hyaluronové	13
2.2.4	Syntéza a katabolismus kyseliny hyaluronové	14
2.2.5	Biologické funkce	15
2.2.6	Využití kyseliny hyaluronové	16
2.3	Kolagenový gel.....	17
2.4	Denzitometrie	18
2.5	Ultrazvuková spektrometrie s vysokým rozlišením (HRUS).....	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
3.1	Použité chemikálie.....	20
3.2	Příprava zásobních roztoků	20
3.2.1	Příprava zásobních roztoků kolagenu	20
3.2.2	Příprava zásobního roztoku kyseliny hyaluronové	20
3.3	Příprava vzorků	20
3.3.1	Příprava vzorků kolagenu ve vodě	20
3.3.2	Příprava vzorků kolagenu v roztoku hyaluronanu	21
3.4	Měření na hustoměru DSA 5000 M	21
3.5	Měření na ultrazvukovém spektrometru s vysokým rozlišením (HRUS)	21

3.6	Výsledky a diskuze.....	22
3.6.1	Měření hustoty a ultrazvukové rychlosti roztoků kolagenu a roztoků kolagenu s hyaluronanem densitometrií	22
3.6.2	Měření ultrazvukové rychlosti roztoků kolagenu a roztoků kolagenu s hyaluronanem ultrazvukovým spektrometrem s vysokým rozlišením (HRUS).....	28
4	ZÁVĚR.....	30
5	POUŽITÁ LITERATURA.....	32
6	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	36
7	PŘÍLOHY.....	37

1 Úvod

Kolagen a kyselina hyaluronová jsou látky, které se ve značném množství vyskytují v lidském těle a dají se snadno izolovat z živé tkáně. Pro své specifické vlastnosti a funkce se hojně využívají v lékařství, v kosmetice a potravinářství.

Kolagen tvoří nezbytnou součást pohybového aparátu, jelikož zajišťuje pevnost, pružnost a odolnost kostí, chrupavek a svalových vláken.^[7] V medicíně se z kolagenu vyrábí například kostní štěpy a scaffoldy pro obnovu tkání.^[12] Působí též antibakteriálně, tudíž ho lze aplikovat při hojení ran. Hydrolyzovaný kolagen se nachází ve formě tablet i v jiných doplňcích stravy.^[2]

Hyaluronan plní v organismu mnoho důležitých funkcí. Představuje jednu ze složek synoviální tekutiny a také nátěrů kloubních chrupavek. Další důležitou úlohu plní při buněčných procesech. V lékařství nalézá velký význam u pacientů trpících osteoporózou a často se využívá při operacích očí.^{[15] [22]}

Obě látky se mohou smíchat za vzniku tzv. kolagenového gelu, jenž se po ztuhnutí chová elasticky, ale stabilně. Tento gel se používá pro vyplňování dutin kostí, jako náhrady cév a nervových vláken.^[23]

V této práci je popsáno, jak závisí hustota na koncentraci roztoků kolagenu v ultra čisté deionizované vodě a roztoků kolagenu s hyaluronanem denzitometricky při různé teplotě. Další používanou metodou je ultrazvuková spektrometrie s vysokým rozlišením (HRUS), pomocí níž se měří závislost ultrazvukové rychlosti na koncentraci obou řad roztoků při 25°C.

2 Teoretická část

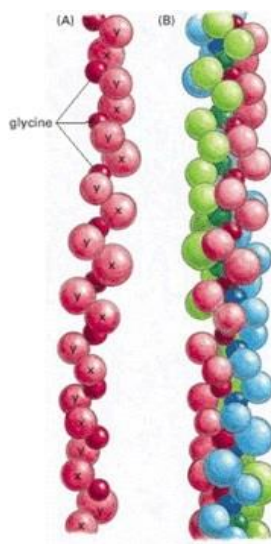
2.1 Kolagen

2.1.1 Charakteristika kolagenu

Kolagen je tvrdý, extracelulární, ve vodě nerozpustný skleroprotein, který zastupuje nejhojnější bílkovinu v lidském těle (70 % kůže) a plní zcela odlišné funkce oproti enzymům.^[1] U savců představuje 25-30 % všech proteinů. Tvoří základní stavební hmotu pojivových tkání (vazy, chrupavky, kosti, zuby), ale také cév, střev, rohovky a meziobratlových plotének.^[2] Fibroblasty vytváří kolagen ve svalové tkáni, kde slouží jako hlavní součást endomyosinu.^[3] Vlákná často utvářejí svazky, které měří v průměru 0,5-1,5 mikrometrů.^[4] Kolagen zodpovídá za pružnost (společně s keratinem) a hlavně pevnost, za správné navlhčení kůže, čímž ovlivňuje vzhled nehtů, zubů a pokožky. Hraje důležitou úlohu též při stárnutí organismu, kdy postupem času dochází k jeho deficitu (tělo si ho přestává samo syntetizovat), což způsobuje tvorbu vrásek, zhoršení kvality vlasů, bolestí kloubů a svalů. Název kolagen pochází z Řecka a znamená „produkovat lepidlo“.^[2] V polovině třicátých let minulého století byla dokázána jeho pravidelná struktura na molekulární úrovni.^[5]

2.1.2 Struktura kolagenu

Molekuly kolagenu tvoří převážně glycin, prolin, hydroxyprolin a hydroxylysin. Každý jeho řetězec obsahuje asi 1000 aminokyselin.^[4] Kolagen se skládá z trojitě levotočivé šroubovice, kterou obvykle tvoří dva stejné řetězce (alfa1) a další řetězec, lišící se v chemickém složení (alfa2).^[6]



Obrázek 1: Struktura řetězce kolagenu. A) Primární struktura. B) Kolagenové vlákno.^[32]

2.1.2.1 Stabilita kolagenového řetězce

Aminokyselinové složení kolagenu je atypické pro proteiny s ohledem na vysoký podíl hydroxyprolinu. Nejběžnější motivy v primární struktuře jsou glycin-prolin-X a glycin-X-hydroxyprolin, kde X představuje jinou aminokyselinu s výjimkou glycinu, prolinu nebo hydroxyprolinu.^[6] Prolin nebo hydroxyprolin tvoří asi 1/6 z celkové sekvence a glycin odpovídá za 1/3 sekvence. Vysoký obsah glycinu (v každé třetí poloze, kde není prostor pro větší postranní skupinu než atom vodíku^[4]) stabilizuje spirály kolagenu ve směru osy šroubovice, čímž umožňuje velmi úzké propojení kolagenových vláken v molekule pomocí vodíkových vazeb a vznik intermolekulárních křížových vazeb. Prstény prolinu a hydroxyprolinu směřují směrem ven a pomáhají stabilizovat trojitě šroubovice.^[6]

2.1.2.2 Velikost a struktura kolagenového vlákna

Vlákno zhruba měří 300 nm s průměrem 1,5 nm.^{[4] [7]} Tyto tři levotočivé šroubovice jsou stočeny do pravotočivé trojitě šroubovice nebo-li "super šroubovice".^{[4] [6] [7]} Právě mnoho takových svázaných tropokolagenů vytváří bílé fibrily, případně mikrofibrily organizované do řídkých sítí nebo uspořádaných svazků (vznikají šlachy). Větší fibrilární svazky vytváří pomocí mnoha různých tříd proteinů (včetně různých typů kolagenu), glykoproteiny a proteoglykany. Vlákna kolagenu tím získávají na ohebnosti, nepružnosti a vysoké pevnosti v tahu. Je dokázáno, že 1 mm² kolagenních vláken udrží 50 kg.^[8]

2.1.3 Typy kolagenu

Doposud bylo zaznamenáno a popsáno 28 typů kolagenu, které lze rozdělit do několika skupin dle struktury.^[8]

Ke kolagenům tvořící vlákna se řadí široce rozšířené kolageny typu I, II, III, V, XI, nově objevené XXIV a XXVII.^[8] U všech vláken tvořící α -řetězce se nachází dlouhá kolagenní doména ukončena terminálními prokolageny.^[4]

Kolagenům vytvářející síť náleží typy IV (bazální membrána), VIII a X. Na rozdíl od první skupiny je kolagen-nekolagenní doména součástí suprastruktur.^[8]

FACIT (volně přeloženo jako Vláknno-asociované kolageny s přerušenou trojitou šroubovicí) tvoří rodinu s typy IX (tři α -řetězce), XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI a XXII (ostatní jeden α -řetězec), kdy doména je krátká přerušovaná několika nekolagenními strukturami.^[8]

Transmembránové kolageny obsahují typy XIII, XVII, XXIII, XXV, jenž se podílí na buněčných povrchových receptorech a v matrixu.^[8]

Typ I, který je používán v této bakalářské práci, představuje 90 % kolagenu v organismech^[8], přítomen v kůži, šlachách, cévách, orgánech, kostech a zubech^[7], tvořící typická 1-20 μ m dlouhá vlákna.^[8] Typ II jsou 20 nm dlouhé fibrily, bez agregace ve vlákna^[8], které utvářejí bazální membránové laminy^[7], hyalinní a elastickou chrupavku. Typ III je nepolymerizovaný tropokolagen tvořící mřížku a běžně se vyskytuje v embryonálním vývoji.^[8] Typ IV představuje složku bazální membrány a epitelu.^[7] Typ V se vyskytuje ve stěnách krevních cév, gliích, zevních laminách a v placentě.^[8]

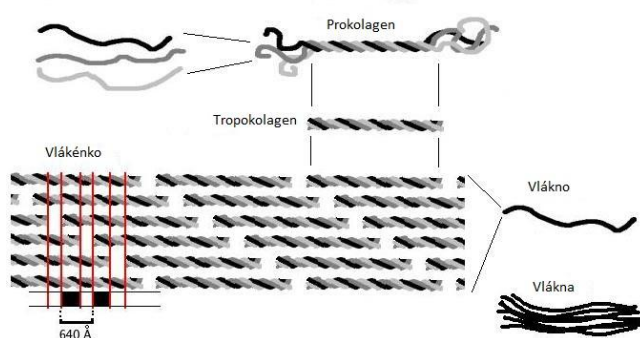
2.1.4 Syntéza a rozpad kolagenu

2.1.4.1 Syntéza a rozpad

Kolagen je produkován především vazivovými buňkami (fibroblasty), buňkami chrupavky (chondroblasty), kostí (osteoblasty), ale i epitelovými buňkami.^[7] Syntéza probíhá vně i uvnitř buňky.^[4] Nejprve trojrozměrná struktura, spletena z glycinu, prolinu a lysinu, prozatím představuje kolagenní prekurzor tzv. prokolagen, který prochází modifikací přidáním hydroxylových skupin na prolin a lysin. Enzymy hydroxylázy, vykonávající tyto reakce, vyžadují kyselinu askorbovou jako kofaktor. Jeho nedostatek se projeví zhoršenou syntézou kolagenu. Hydroxylace lysinových („lysylhydroxylázou“- výroba hydroxylysinu)

a prolinových ("prolylhydroxylázou"-výroba hydroxyprolinu) zbytků na propeptidu podporuje zesílení alfa peptidů.^[9] Procesem glykosylace se přidá buď glukóza, nebo galaktóza na hydroxylové skupiny, které byly umístěny pouze na lysinových zbytcích. Po těchto modifikacích vznikly hydroxylované a glykosylované propeptidy tvarované do trojitě šroubovice. Poté tyto prokolagenové svazky postupují k extracelulárnímu prostoru. Na povrchu buňky se vážou enzymy, prokolagenpeptidázy, jenž odstraní nekolagenní a kolagenní konce z prokolagenu a vznikne tropokolagenní fibril. Tyto jednotky se řadí lineárně v paralelních vláknech a pak jsou spojeny s mezerou, která hraje roli ve stavbě kostí. Konečný krok v syntéze vytváří extracelulární enzym, lisyloxidáza. Ten působí na lysinu a hydroxylysínu produkující aldehydové skupiny, mezi nimiž se uskuteční kovalentní vazba molekul tropokolagenu. Několik těchto vláken tvoří kolagen.^[4]

Rozklad kolagenu v mezibuněčných prostorech umožňují zejména kolagenázy.^{[4] [7]}



Obrázek 2: Syntéza kolagenového řetězce.^[33]

2.1.4.2 Faktory, způsobující rozklad kolagenu

Hladinu kolagenu lze poškodit celou řadou faktorů, jako je například vysoká spotřeba cukru, kouření, ultrafialové záření ze Slunce a protilátky způsobující autoimunitní onemocnění. Na kódování alfa řetězců mohou mít vliv i různé druhy mutací probíhající v extracelulárním matrixu. Ty vedou ke snížení množství kolagenu jeho vylučováním a tím přispívají různým nemocem na úrovni tkání.^[2] Nemoci kolagenu také souvisejí s nedostatky ve výživě, které ovlivňují důležité procesy (biosyntézu a posttranslační modifikace). Nemoc *osteogenesis imperfecta* zapříčiňuje mutace prvního typu kolagenu a má za následek slabé kosti a nesouměrnost pojivové tkáně. Osteoporóza souvisí s věkem a je spojená s nižším obsahem kolagenu v kůži a kostech.^[10]

2.1.5 Využití kolagenu

Díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem a přirozenosti pro organismus (hlavně u savců) se kolagen využívá v mnoha oborech. Mezi nejčastější patří kosmetika, medicína společně s vědou a výzkumem, potravinářství a jiné.

V lékařství a výzkumu se z této látky vyrábí např. kostní štěpy^[11], scaffoldy pro obnovu tkání (kůže, srdeční svalovina), nosiče léčiv^[12], antibakteriální filmy, které podporují hojení ran a působí proti infekcím.^[13] Hydrolyzovaný kolagen ve formě tablet a práškový kolagen se nachází jako doplňky stravy (*Colafit*, *Cemio Kamzík* a další konkrétní výrobky na stránkách : <http://www.prozdravi.cz>).

V dnešní době se velmi často objevují kosmetické výrobky s obsahem kolagenu, jakožto různé gely, krémy a masti, dále také injekce za účelem vyhlazování vrásek. Pro tyto účely se používá derivovaný čistý vepřový, hovězí a „živý“ rybí kolagen. Rybí kolagen se nejvíce podobá lidskému, tudíž se snadněji vstřebává a účinkuje výrazně rychleji než ostatní typy kolagenu. Podrobnější informace o konkrétních produktech lze nalézt například na - <http://www.kolageny.cz/>

Želatina, nebo-li tepelně denaturovaný kolagen s neuspořádanou konformací, hraje důležitou roli v potravinářském průmyslu, pro výrobu cukrovinek (Haribbo medvídci), také v papírenském průmyslu a dříve pro fotografické materiály jako pojivo.^[4]

2.2 Kyselina hyaluronová

2.2.1 Charakteristika kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová, označována též jako hyaluronan, je běžně se nacházející polyanionický glykosaminoglykan, jinak řečeno lineární polysacharid o velké molekulové hmotnosti. Kyselina hyaluronová je tvořena z opakujících se disacharidových jednotek, přičemž jedna jednotka se skládá z kyseliny D-glukuronové a *N*-acetyl-D-glukosaminu.^[14] Velikost molekuly a prostorové uspořádání udávají kyselině hyaluronové různorodé biologické vlastnosti. Tato vysoce hydrofilní molekula může absorbovat obrovské množství vody, čímž dosáhne rozměru až do 1-2 milionů Da.^[15] Tuto látku lze v organismu nalézt ve fyziologickém roztoku jako sodnou nebo jinou sůl.^[14]

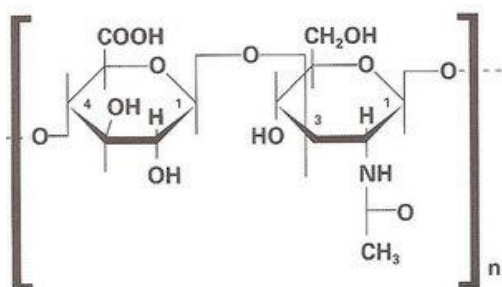
2.2.2 Výskyt kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová se vyskytuje u obratlovců, bakterií, virů a hub. Vytváří se v extracelulárních matricích mnoha tkání a v některých představuje jejich hlavní složku (pojivové, epiteliální a nervové tkáně). Velké koncentrace se nachází v synoviální tekutině, v pupeční šňůře, v očním sklivci a v kožní tkáni, jak v dermisu, tak v epidermisu. Mělo by se zdůraznit, že vzhledem k vysokému výskytu v lidském těle, je kyselina hyaluronová hojně využívaným materiálem pro mnohé aplikace.^[15]

2.2.3 Struktura kyseliny hyaluronové

2.2.3.1 Disacharidová jednotka

V disacharidové jednotce kyseliny hyaluronové se D-glukuronové kyseliny a *N*-acetyl-D-glukosaminy vážou glykosidickými vazbami střídavě přes β -1,4 a β -1,3. Energetickou stabilitu podporuje disacharidová stereochemie, kdy oba sacharidy tvoří deriváty glukosy, jenž její beta konfigurace umožňuje všem objemným skupinám (hydroxylové, karboxylové, acetamidové) být ve stericky příznivé ekvatoriální pozici, načež veškeré menší atomy vodíku zaujímají méně stericky optimální axiální polohy.^[15]



Obrázek 3: Struktura disacharidové jednotky kyseliny hyaluronové.^[34]

2.2.3.2 Struktura a velikost polymeru

Molekulová hmotnost hyaluronanu se pohybuje v rozmezí 50 až 20.000.000 Da in vivo. Například průměrná hmotnost v lidské synoviální tekutině se pohybuje od 3 po 4 milionů Da.^[16] Obvyklá délka disacharidu je 1 nm, tím pádem kompletní molekula s 10 000 jednotkami po natažení od konce ke konci dosáhne 10 μ m, kdy tato délka se přibližně shoduje s průměrem lidského erytrocytu.^[15]

2.2.3.3 Struktura polymeru v roztocích

Ve vodě kyselina hyaluronová agreguje za vzniku preferovaného tvaru, pomocí vazeb mezi hydrofobními místy. Ve fyziologickém roztoku hlavní řetězec molekuly stabilizuje jednak chemická struktura disacharidu, dále vnitřní vodíkové můstky a nakonec interakce s rozpouštědlem.^[15]

2.2.4 Syntéza a katabolismus kyseliny hyaluronové

2.2.4.1 Syntéza řetězce

Syntéza kyseliny hyaluronové v buňkách obratlovců a u grampozitivních streptokoků se liší od syntézy ostatních polysacharidů v mnoha ohledech.^[15] U obratlovců existují tři typy enzymů hyaluronan-syntázy : HAS1, HAS2 a HAS3. Molekula je prodlužována na redukujícím konci střídavým přenosem UDP-kyseliny hyaluronové k substrátům UDP-N-acetylglukosaminu a UDP-glukuronová kyselina (aktivované nukleotidové cukry), za současného uvolnění UDP. Dochází k vytlačení řetězců do extracelulárního prostoru přes buněčnou membránu ABC-transportérem.^[17] Ostatní glykosaminoglykany narůstají na neredukujícím konci a většina se tvoří v Golgiho aparátu, naproti tomu kyselina hyaluronová se syntetizuje v plazmatické membráně. Bylo dokázáno, že syntézou této kyseliny lze inhibovat 4-methylumbelliferon a 7-hydroxy-4-methylkumarin derivát, což se může využít proti metastázám maligních nádorových buněk.^[18]

2.2.4.2 Buněčné receptory

Buněčné receptory pro kyselinu hyaluronovou lze rozdělit do tří hlavních skupin, a to CD44, RHAMM a intercelulární adhezní molekuly-1 (ICAM-1). Nejznámější CD44, jenž je distribuován po celém těle, funguje jako hlavní receptor buněčného povrchu, kdy zprostředkovává buněčnou interakci s kyselinou hyaluronovou, dále agregaci buněk, migraci, proliferaci a aktivaci.^[15]

2.2.4.3 Katabolismus a degradace

Degradace kyseliny hyaluronové lze způsobit mechanicky ultrazvukem, tepelně, fyziologicky volnými kyslíkovými radikály nebo enzymaticky prostřednictvím hyaluronidáz.^[19] Katabolismus kyseliny hyaluronové zahrnuje rozpad řetězce na monomery, jenž využívají jiné tkáně. Z krevního oběhu ho odchyťávají díky buněčným receptorům (CD44, RHAMM a další) parenchymatické frakce jaterních buněk (endoteliální buňky), které ji rozloží až na nízkomolekulární produkty. Enzymatická degradace kyseliny hyaluronové se následně uskutečňuje v lysozomech, na nichž se podílejí jak hyaluronidázy, tak i například glukuronidázy, glykosidázy a některé další. Konečné degradační produkty se při analýze chovají jako laktáty a acetáty. Metabolismus kyseliny hyaluronové úzce souvisí s metabolismem acetylových skupin přes acetyl-CoA. Exkrece kyseliny hyaluronové je převážně limitována molekulovou hmotností struktury.^[15]

2.2.5 Biologické funkce

Kyselina hyaluronová plní v organismu spoustu důležitých funkcí.^[15] Jakožto hlavní složka synoviální tekutiny, zvyšuje viskozitu kapaliny, a společně s lubricinem se nachází v kloubních chrupavkách jako „nátěr“ kolem každé buňky, aby inhibovaly její degradaci.^[20] Významně přispívá k buněčné proliferaci, migraci^[15] a moduluje varovné signály (záněty) při uvolňování cytokinů a chemokinů. Zabraňuje virům a bakteriím v procházení přes pericelulární matrix k buňce a také podporuje bezjizvé hojení tkáně, jelikož nedovoluje ukládání kolagenu. Agregátové monomery se naváží na kyselinu hyaluronovou v přítomnosti kyseliny a vzniká velmi negativní agregát, který absorbuje vodu a tím též zodpovídá za odolnost chrupavek vůči tlaku. Dále také přispívá hydrodynamice, reakcím na povrchu buněk s receptory a nakonec s TLR hrají roli v přirozené imunitě.^[21]

2.2.6 Využití kyseliny hyaluronové

Fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti, hlavně viskoelasticita a hydratace, umožňují kyselině hyaluronové široké možnosti pro užití v lékařských i jiných průmyslových odvětvích jako je kosmetologie, revmatologie, diabetologie, dermatologie, plastická chirurgie a jiné. Kyselina hyaluronová se přidává do kosmetických produktů „pro omlazení“ pleti vyplňováním vrásek. V medicíně byly vyzkoumány poznatky v boji proti některým druhům rakoviny, kdy se zjistilo menší riziko vzniku nádorových buněk u lidí s vyšším procentem obsahu kyseliny hyaluronové v těle. Dále tato látka pomáhá při hojení ran, kdy ovlivňuje vzájemné procesy iniciované hemostáze a uvolnění faktorů, odvozený od krevních destiček. V neposlední řadě by se mělo zmínit, že kyselina hyaluronová se aplikuje pacientům s osteoporózou a slouží k dočasnému vyplnění přední komory oční, a též k ochraně proti nitroočnímu poškození (hlavně při operacích šedého zákalu atd.).^{[15] [22]}

2.3 Kolagenový gel

Zesítním polyaniontu a ve vodě rozpustného karbodiimidu na bázi kolagenu lze získat kolagenový gel. Je to hydrogel, který jakmile ztverdne, chová se pružně. Běžně je používán jako vhodný materiál do farmaceutických a zdravotnických přípravků.^[23]

Pro přípravu kolagenového gelu se nejčastěji využívá kolagen typu I a III, který je extrahován z různých zvířat působením enzymů, například pepsinu, trypsinu, nebo chymotrypsinu. Tento gel se více podobá živé tělesné tkáni, díky své vyšší molekulové hmotnosti oproti želatině. Kolagenový gel napomáhá v hojení ran svou fyziologickou aktivitou (svou absorbcí) a eliminuje riziko virové infekce.^[23] V nedávné době byl vynalezen postup pro získání kolagenového gelu z ryb, jenž se vyznačuje vysokou mechanickou pevností a vynikající tepelnou stabilitou. Předpokládá se, že právě takto vyrobený kolagenový gel bude hojně využíván v regenerační terapii.^[24]

Ve zdravotnictví tento gel nalézá uplatnění při adhezi řezných ran, pro lepení kůže, nebo pro upevnění kožních štěpů. Během chirurgického zákroku lze gel vytvořit přímo za přítomnosti vlhkosti, kde s jeho pomocí se může zastavit krvácení z mikrocév orgánů. Jinou aplikační metodou je potažení hotového kolagenového gelu na postiženou oblast. Kromě toho gel slouží k vyplňování mrtvého prostoru v dutinách kostí, chrupavkách a alveolárních dutin. Díky slabé imunogenicitě a dostatečné pevnosti se hodí k výrobě lékařských materiálů, jako jsou umělé cévy, umělé trubice pro nervová vlákna a umělý jícn.^[23]

Schopností urychlit obnovení poškozené tkáně za účasti kolagenového gelu se zabýval výzkum v oblasti kraniofaciální chirurgie, kde cílem bylo zhodnotit osteogenní účinky hustých kolagenových gelových scaffoldů naočkovaných mezenchymálními kmenovými buňkami z dentální buničiny (DPSC) pro regeneraci kostí. Testování probíhalo na dvou symetrických modelech defektů o průměru 5 mm. Jeden z nich byl naplněn hustým kolagenovým gelovým scaffoldem obsahujícím nasycené DPSC a druhý byl vyplněn nebuněčným scaffoldem. Výsledky tohoto výzkumu potvrzují, že tam, kde byl aplikován kolagenový gelový scaffold obohacený DPSC, se během krátké doby hustota kostní dřeně zvýšila, tím pádem se tkáň rychleji obnovila. Na základě této studie byl prokázán potenciál ve využívání kolagenových gelových scaffoldů s DPSC při použití technik tkáňového inženýrství pro klinicky významné kraniofaciální kostní poškození.^[25]

2.4 Denzitometrie

Pomocí hustoměru DSA 5000 M, od firmy Anton Paar, jsou měřeny dvě fyzikálně-chemické vlastnosti, hustota a ultrazvuková rychlost. Vzorek je převeden do U-borosilikátové skleněné trubice, kde začne vibrovat při své charakteristické frekvenci, jenž se mění v závislosti na hustotě vzorku. Díky přesnému stanovení této frekvence a matematickému převedení lze získat hustotu vzorku. Při měření ultrazvukové rychlosti je vzorek umístěn v cele ohraničené ultrasonickým transmiterem z jedné strany a z druhé strany přijímačem. Transmitter posílá zvukové vlny o známé frekvenci skrz vzorek. Rychlost zvuku lze poté vypočítat z periody přijaté zvukové vlny s ohledem na vzdálenost mezi transmiterem a přijímačem.^[26]

Přístroj se dá snadno využít ke stanovení koncentrací binárních, ternárních směsí, explozivních látek, detergentů, koloidů a dalších chemikálií.^[26]

Jedním ze způsobů použití tohoto přístroje bylo měření hustoty a ultrazvukové rychlosti roztoku hyaluronanu ve vodě a roztoku hyaluronanu v chloridu sodném. U obou koncentračních řad se hustota lineárně zvyšuje s koncentrací a snižuje s teplotou. Z naměřené ultrazvukové rychlosti se vypočetla stlačitelnost a její závislost na koncentraci a teplotě.^[27] Obdobné výsledky byly naměřeny pro roztoky kolagenu a hyaluronanu v koloidním stříbře.^[28] Dalším příkladem použití bylo měření karagenanu, které je podrobněji popsáno v bakalářské práci^[29], kde vzorky byly měřeny při vzrůstající i při klesající teplotě. Bylo dokázáno, že hustota u jednotlivých vzorků s rostoucí koncentrací lineárně roste a s teplotou klesá. Nicméně u gelovitějších roztoků o vyšší koncentraci, zkoumané při nejvyšší teplotě, se objevily větší odchylky od linearit kvůli rozpínání, hysterezi a pohybu molekul. S rostoucí koncentrací roztoků karagenanu bylo prokázáno zvyšování ultrazvukové rychlosti. Totéž platí pro její závislost na teplotě. Částice se pohybují rychleji, čímž dochází k rozestupu molekul, což sníží hustotu, zatímco zvuk se touto strukturou šíří snadněji. Podobné hodnoty byly zaznamenány i v prostředí chloridu sodného.^[29]

2.5 Ultrazvuková spektrometrie s vysokým rozlišením (HRUS)

Ultrazvuková spektrometrie s vysokým rozlišením je metoda, pomocí níž lze měřit ultrazvukovou rychlost a zeslabení. Princip měření spočívá ve vytvoření elektronického signálu, který je přeměněn přes piezotransduktor na ultrazvukové vlny pohybující se skrz vzorek. Dále piezotransduktor přemění tyto vlny na elektrický signál, který je analyzován. Ultrazvukovou rychlost lze zjistit pomocí vlnové délky a oscilační frekvence.^{[29] [30]} Ultrazvuková rychlost závisí na hustotě a pružnosti daného materiálu, čímž se můžou analyzovat interakce, jež s uspořádáním molekul úzce souvisí.^[29] Zeslabení popisuje energetický úbytek amplitudy vlny za určitý čas a může vystihovat např. viskozitu vzorku. Deformující amplitudy bývají velmi malé, čímž se brání destrukci částic ve vzorku.^{[30] [31]}

U ultrazvukového spektrometru s vysokým rozlišením probíhá měření obou veličin při nastavených frekvencích od 2700 kHz do 14900 kHz, přičemž každou frekvenci charakterizuje určitý pík.^[31]

Velký přínos ultrazvukového spektrometru s vysokým rozlišením představuje univerzálnost v měření koloidů, jelikož ultrazvukové vlny prochází většinou materiálů i skrz zakalené vzorky. Další výhodou HRUS je rychlá příprava vzorku, možnost měření širokého spektra vzorků a také použití několika měřících režimů (kinetický, titrační a teplotní). K měření je potřeba malé množství vzorku (1 ml).^[30]

Měření umožňuje analyzovat kinetiku chemické reakce, agregace, gelovatění, krystalizace a mikrostrukturu materiálu. Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením například detekuje a analyzuje termickou analýzu, kvalitu kapalin, konformační změny v polymerech, interakce antigenu s protilátkou. Dalším příkladem použití může být také měření koncentrace micel v koloidních roztocích.^[30]

Praktickým příkladem použití HRUSu bylo měření roztoků pektinu a pektátu, kde bylo zjištěno, že ultrazvuková rychlost je lineárně závislá na koncentraci roztoků a nejvyšších hodnot bylo dosaženo vždy u nejvíce koncentrovaných vzorků. V prostředí fyziologického roztoku a PBS byly výsledné hodnoty relativní ultrazvukové rychlosti vyšší, jelikož již samotná hustota rozpouštědel je zvýšená oproti ultra čisté deionizované vodě. Hodnoty relativního zvukového zeslabení neukazovaly zjevný trend. Při srovnání ultrazvukových rychlostí mezi roztoky pektinu a pektátu bylo viditelné, že všechny hodnoty pektátu v daných prostředích jsou vyšší, což lze přisoudit jeho vyšší molekulové hmotnosti.^[31]

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Kolagen – Natural collagen Inventia, číslo výrobku 010214, expirace 08/2015

Hyaluronan – Contipro Biotech s.r.o., 13 kDa, Batch No: 021014- E1, expirace 22.9.2016, specifikace 392-10-01,

Ultra čistá deionizovaná voda z přístroje PURELAB

3.2 Příprava zásobních roztoků

3.2.1 Příprava zásobních roztoků kolagenu

Zásobní roztoky byly připravovány navážením potřebného množství kolagenu do skleněné odměrné nádoby s uzávěrem, aby vznikly vodné roztoky o koncentraci 10, 20 a 30 g/l o výsledném objemu 50 ml. Rozpouštědlem byla ultra čistá deionizovaná voda z přístroje PURELAB. Roztoky se daly míchat na magnetickou míchačku. Míchání trvalo 24 hodin při laboratorní teplotě.

3.2.2 Příprava zásobního roztoku kyseliny hyaluronové

Zásobní roztok byl vytvořen rychlým, šetrným navážením práškové kyseliny hyaluronové a následně zalit 100 ml ultra čisté deionizované vody z přístroje PURELAB, čímž byla získána potřebná koncentrace 5 g/l. Roztok byl poté míchán na magnetické míchačce 24 hodin při laboratorní teplotě.

3.3 Příprava vzorků

3.3.1 Příprava vzorků kolagenu ve vodě

Pro přípravu vzorků koncentrační řady 1-30 g/l s krokem 1 g/l kolagenu ve vodě bylo třeba naředit zásobní roztoky tak, aby celkový objem každého vzorku činil 5 ml. Vzorky byly nachystány postupně zředěním potřebného zásobního roztoku do malých uzavíratelných skleněných lahvíček a dány na míchačku 24 hodin před samotným měřením při laboratorní teplotě.

3.3.2 Příprava vzorků kolagenu v roztoku hyaluronanu

Příprava vzorků kolagenu v roztoku hyaluronanu byla principem stejná jako pro předchozí koncentrační řadu. Opět se měla nachystat koncentrační řada 1-30 g/l s krokem 1 g/l kolagenu, nicméně tentokrát v roztoku hyaluronanu o stálé výsledné koncentraci hyaluronanu 1 g/l. Celkový objem vzorku byl 5 ml, kdy 4 ml byly roztoku kolagenu a 1 ml roztoku hyaluronanu. Jako v předešlém případě byly vzorky chystány postupně dle připravenosti zásobního roztoku a dány na míchačku minimálně půl hodiny před samotným měřením při laboratorní teplotě.

3.4 Měření na hustoměru DSA 5000 M

Vzorky byly měřeny na hustoměru DSA 5000 M, který včetně hustoty dokáže stanovit ultrazvukovou rychlost. Obě veličiny byly proměřeny při nastavení teplotního skenu od 20-50°C s krokem 5°C. Před samotným měřením bylo potřeba provést kalibraci přístroje, nebo-li kontrolu na referenční prostředí, což byla ultra čistá deionizovaná voda z přístroje PURELAB. Vzorky dle vzrůstající koncentrace, o objemu zhruba 3 ml, byly zbaveny vzduchových bublin v injekční stříkačce a následně opatrně nadávkovány do U-trubice tak, aby nevznikly jiné vzduchové bubliny. Celý proces dávkování bylo možné sledovat přes kameru na hlavním displeji přístroje. Samotné měření trvalo 45 minut.

3.5 Měření na ultrazvukovém spektrometru s vysokým rozlišením (HRUS)

Pomocí přístroje HR-US 102 byly měřeny roztoky kolagenu v ultra čisté deionizované vodě a roztoky kolagenu a hyaluronanu v ultra čisté deionizované vodě při konstantní teplotě 25°C. Přístroj se skládá ze dvou cel, měřicí (nachází se vzorek) a referenční (obsahuje referenční prostředí – vodu). Před zahájením měření bylo nutné obě cely řádně vypláchnout destilovanou vodou. Součástí přípravy před samotným dávkováním ultra čisté deionizované vody bylo její odplynění pomocí centrifugy při 3000 rpm po dobu 5 minut. Poté byla tato voda do obou cel napipetována o objemu 1 ml. Samotné měření probíhalo při sedmi frekvencích v rozsahu 2864 kHz – 17 220 kHz v tzv. rezonančním nastavení, kdy každé frekvenci připadá příslušné číslo píku. Čísla píků a konkrétní frekvence pro ultra čistou vodu byly 23 pro 2867 kHz, 41 pro 5233 kHz, 66 pro 8099 kHz, 93 pro 11338 kHz, 98 pro 12198 kHz, 120 pro 14819 kHz a 200 pro 17180 kHz.

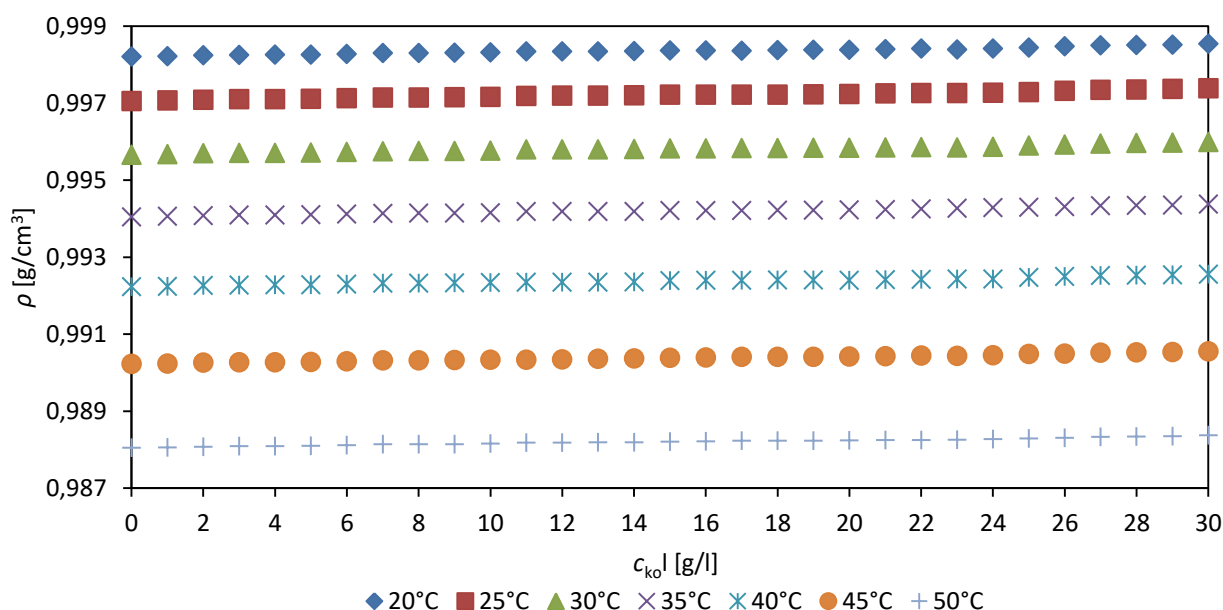
3.6 Výsledky a diskuze

3.6.1 Měření hustoty a ultrazvukové rychlosti roztoků kolagenu a roztoků kolagenu s hyaluronanem densitometrií

Hustota a ultrazvuková rychlost byly měřeny pomocí hustoměru DSA 5000M pro vzorky roztoků kolagenu v ultra čisté deionizované vodě z přístroje PURELAB a roztoků kolagenu s hyaluronanem v ultra čisté deionizované vodě z přístroje PURELAB. Teplotní sken byl měřen od teploty 20 do 50°C s krokem 5°C.

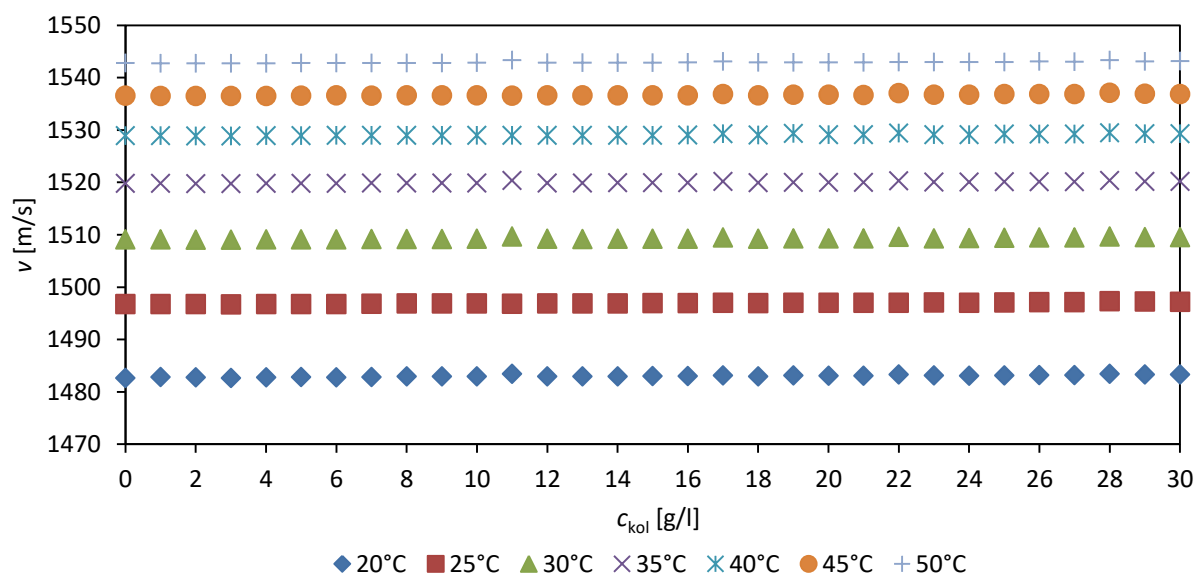
3.6.1.1 Roztoky kolagenu v ultra čisté deionizované vodě

Veškeré vzorky byly měřeny minimálně dvakrát. Výsledné hodnoty hustot a ultrazvukových rychlostí všech vzorků roztoku kolagenu v ultra čisté deionizované vodě z přístroje PURELAB o koncentraci 0-30 g/l v závislosti na teplotním skenu byly zaznamenány graficky.



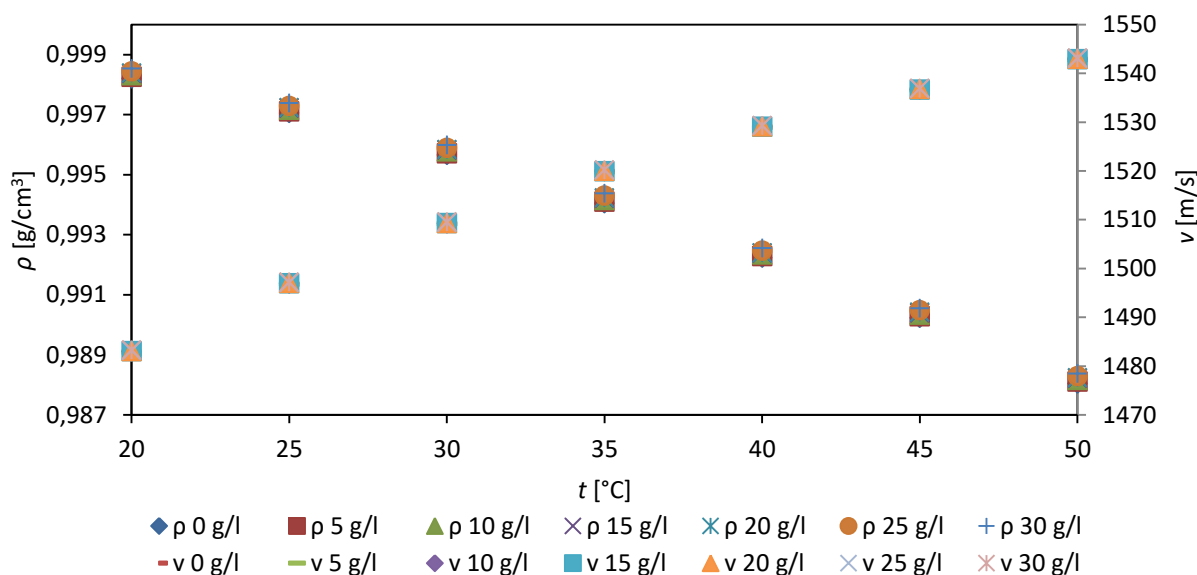
Graf 1: Závislost hustoty na koncentraci kolagenu 0-30 g/l pro teploty 20-50°C.

V Grafu 1 je popsána závislost hustoty na koncentraci roztoků kolagenu od 0 do 30 g/l s krokem 1 g/l pro teploty od 20°C do 50°C s odstupem 5°C. Z grafu je vidět, že se vzrůstající teplotou klesá hustota roztoků.



Graf 2: Závislost ultrazvukové rychlosti na koncentraci kolagenu 0-30 g/l pro teploty 20-50°C.

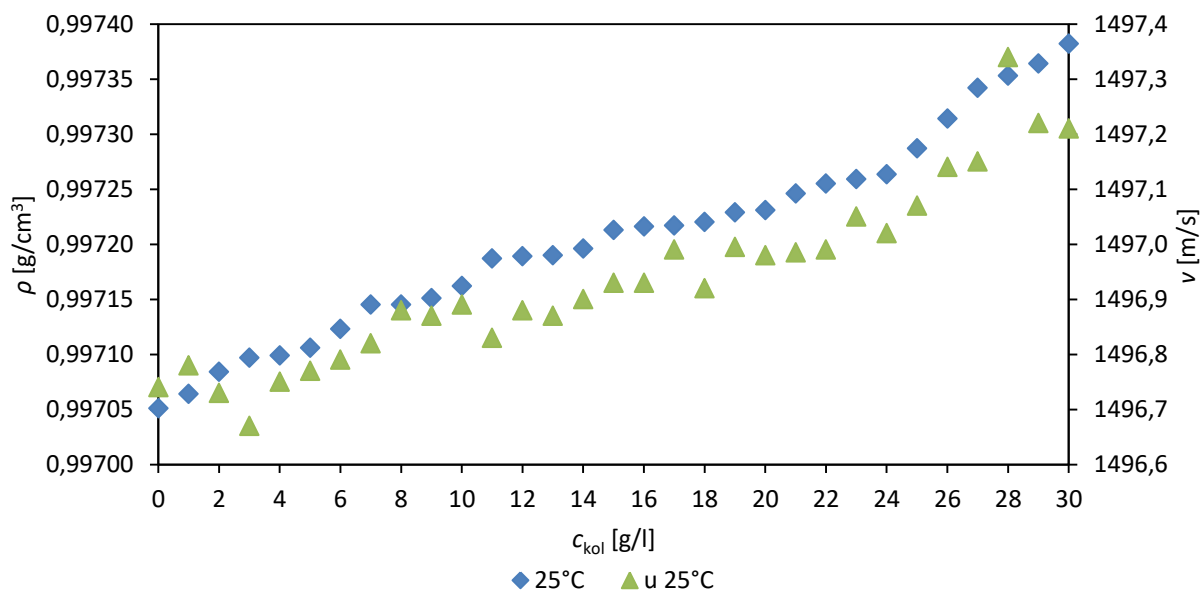
Graf 2 znázorňuje závislost ultrazvukové rychlosti na koncentraci roztoků kolagenu od 0 do 30 g/l s krokem 1 g/l pro teploty od 20°C do 50°C zaznamenané po 5°C. Lze vidět, že s rostoucí teplotou narůstá ultrazvuková rychlost.



Graf 3: Závislost hustoty a ultrazvukové rychlosti na teplotě v rozsahu 20-50°C roztoku kolagenu o koncentraci 0, 5, 10, 15, 20, 25 a 30 g/l.

V Grafu 3 je popsána závislost hustoty a ultrazvukové rychlosti na teplotě od 20°C do 50°C s krokem 5°C u roztoků kolagenu pro koncentrace 0, 5, 10, 15, 20, 25 a 30 g/l. Z naměřených dat je vidět, že hustota s rostoucí teplotou klesá, naproti tomu ultrazvuková rychlost s nárůstem teploty stoupá. Je to zapříčiněno tím, že se zvyšující teplotou se částice

více rozkmitají, čímž dochází k většímu rozestupu mezi jednotlivými molekulami, hustota se sníží a zvuk se šíří rychleji. Nejvyšší hustotu má vzorek o koncentraci 30 g/l při teplotě 20°C ($\rho=0,998536 \text{ g/cm}^3$). Nejnižší hustotu představuje ultra čistá deionizovaná voda z přístroje PURELAB (0 g/l) pro teplotu 50°C ($\rho=0,988043 \text{ g/cm}^3$). Nejvyšší hodnotou ultrazvukové rychlosti má vzorek o koncentraci 30 g/l při teplotě 50°C ($v=1543,15 \text{ m/s}$) a nejnižší hodnotu nabývá vzorek ultra čisté deionizované vody z přístroje PURELAB (0 g/l) pro 20°C ($v=1482,64 \text{ m/s}$).

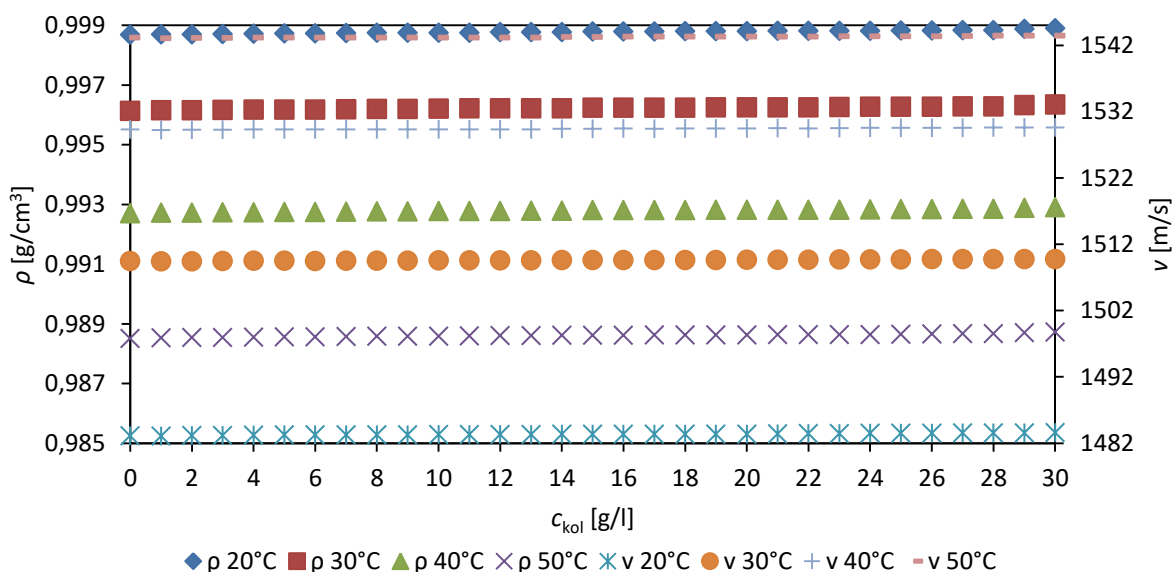


Graf 4: Závislost hustoty a ultrazvukové rychlosti roztoků kolagenu na koncentraci 0-30 g/l při teplotě 25°C.

Graf 4 zaznamenává závislost hustoty a ultrazvukové rychlosti roztoků kolagenu o koncentracích od 0 do 30 g/l po 1 g/l pro teplotu 25°C. Zde lze podrobněji vidět rostoucí hustotu a ultrazvukovou rychlost v závislosti na rostoucí koncentraci. Křivka pro hustotu vytváří v tomto případě téměř lineární charakter od 0 g/l po 23 g/l. Od koncentrace 24 do 30 g/l kolagenu je vidět prudší nárůst mezi jednotlivými koncentracemi. Ultrazvuková rychlost, jak již bylo výše zmíněno, narůstá se zvyšující se koncentrací, nicméně odchylky od linearit jsou větší než u hustoty ($\Delta\rho_{\text{směr.}} = \pm 8,9 \cdot 10^{-5} \text{ g/cm}^3$, $\Delta v_{\text{směr.}} = \pm 15934,7 \cdot 10^{-5} \text{ m/s}$). Pro koncentrace kolagenu od 0 do 10 g/l se ultrazvuková rychlost přibližně pohybuje mezi 1496,6 a 1496,9 m/s, od 11 do 22 g/l je ultrazvuková rychlost od 1496,8 do 1496,99 m/s a od 23 do 30 g/l má ultrazvuková rychlost hodnotu od 1497 do 1497,35 m/s.

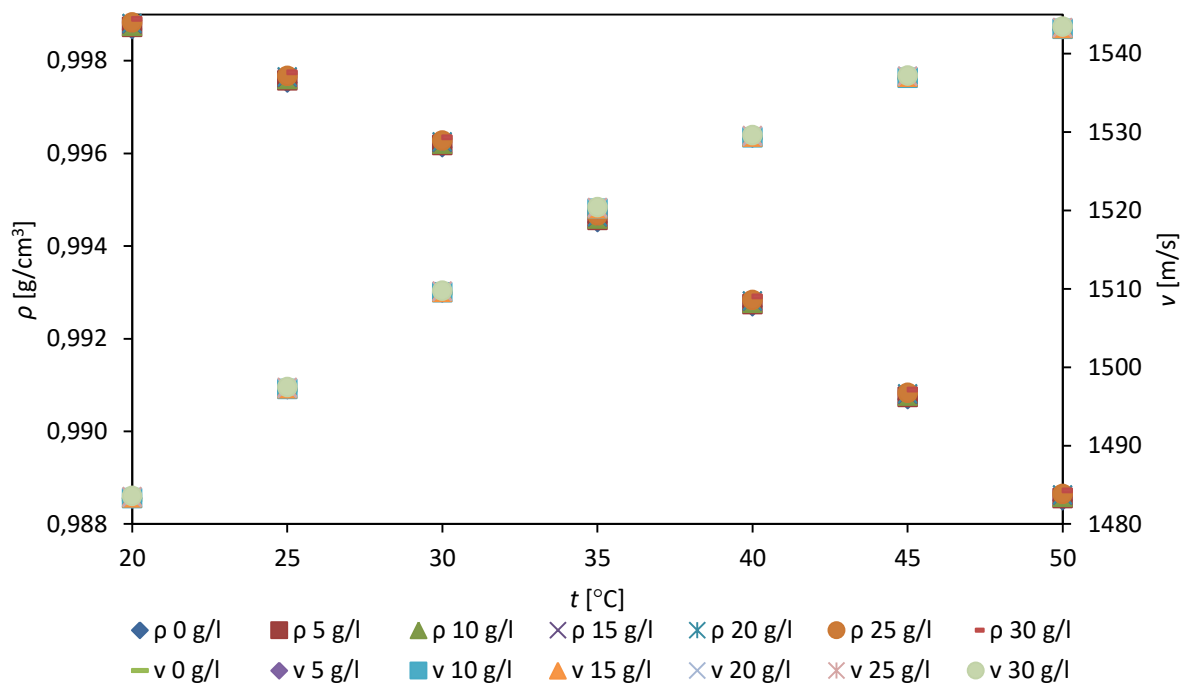
3.6.1.2 Roztoky kolagenu s hyaluronanem v ultra čisté deionizované vodě

Veškeré vzorky kolagenu s hyaluronanem byly měřeny za stejných podmínek jako vzorky samotného kolagenu v ultra čisté deionizované vodě. Měření každého vzorku proběhlo minimálně dvakrát. Výsledné hodnoty hustot a ultrazvukových rychlostí pro vzorky kolagenu s hyaluronanem v ultra čisté deionizované vodě o koncentraci kolagenu 0-30 g/l, kde koncentrace hyaluronanu je 1 g/l, byly zaznamenány graficky.



Graf 5: Závislost hustoty a ultrazvukové rychlosti na koncentraci 0-30 g/l pro teploty 20, 30, 40 a 50°C.

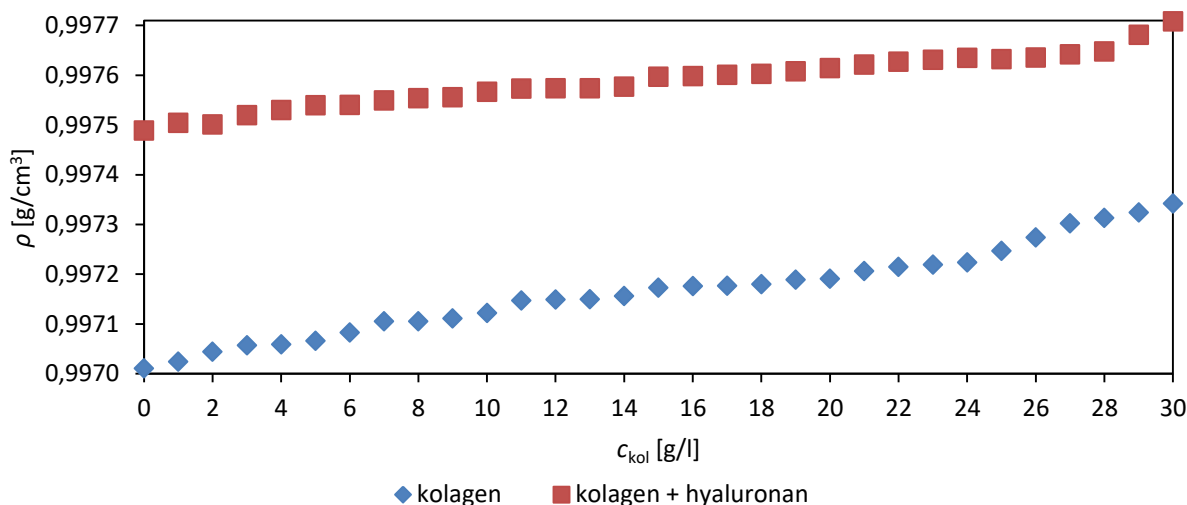
Roztoky kolagenu s hyaluronanem vykazují velmi podobné závislosti hustoty a ultrazvukové rychlosti jako roztoky kolagenu. V Grafu 5 jsou na základě těchto poznatků zaznamenány závislosti hustot a ultrazvukových rychlostí pouze pro čtyři teploty, a to 20, 30, 40 a 50°C. Rovněž zde platí, že s rostoucí teplotou se hustota snižuje a ultrazvuková rychlost zvyšuje.



Graf 6: Závislost hustoty a ultrazvukové rychlosti na teplotě v rozsahu 20-50°C roztoku kolagenu s hyaluronanem o koncentraci 0, 5, 10, 15, 20, 25 a 30 g/l kolagenu.

V Grafu 6 je popsána závislost hustoty a ultrazvukové rychlosti na teplotě od 20°C do 50°C s krokem 5°C u roztoků kolagenu s hyaluronanem pro koncentrace 0, 5, 10, 15, 20, 25 a 30 g/l kolagenu. Podobné hodnoty jsou zaznamenány v Grafu 3. Nejvyšší hustotu má vzorek o koncentraci 30 g/l kolagenu při teplotě 20°C ($\rho=0,998903 \text{ g/cm}^3$). Nejnížší hustotu představuje roztok 0 g/l kolagenu pro teplotu 50°C ($\rho=0,988507 \text{ g/cm}^3$). Nejvyšší ultrazvukovou rychlost má vzorek o koncentraci 30 g/l při teplotě 50°C ($v=1543,45 \text{ m/s}$) a nejnižší hodnotu nabývá vzorek 0 g/l kolagenu pro 20°C ($v=1482,89 \text{ m/s}$).

3.6.1.3 Porovnání hustoty kolagenu ve vodě a hustoty kolagenu s hyaluronanem ve vodě



Graf 7: Závislost hustoty roztoků kolagenu a roztoků kolagenu s hyaluronanem na rostoucí koncentraci kolagenu 0-30 g/l při 25°C.

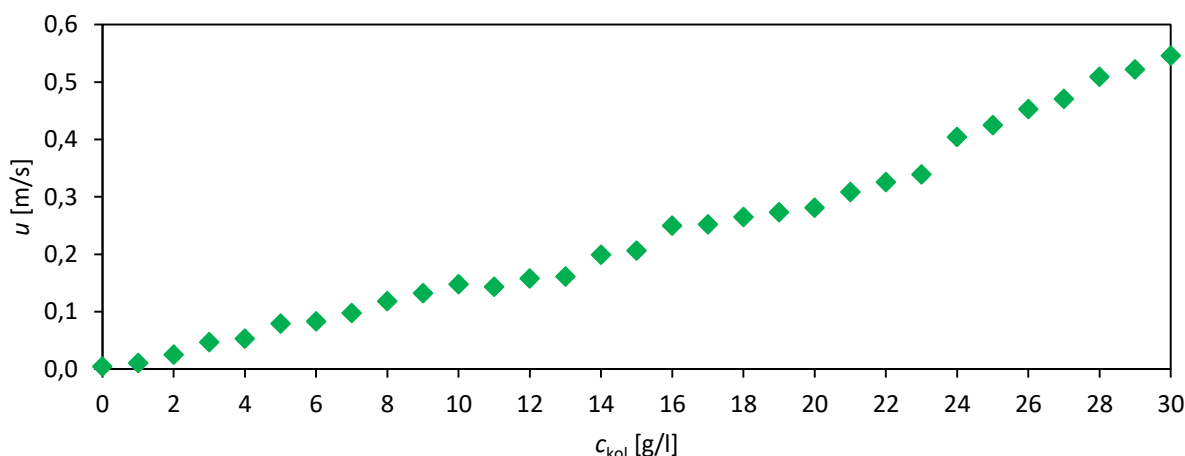
Graf 7 charakterizuje závislost hustoty na koncentraci 0-30 g/l u roztoků kolagenu ve vodě a závislost hustoty roztoků kolagenu s hyaluronanem ve vodě při 25°C. Je zřejmé, že hustoty roztoků kolagenu s hyaluronanem jsou v porovnání s roztoky samotného kolagenu vyšší. Totéž platí i pro ultrazvukovou rychlost (**Graf XI**). Je to dáno tím, že roztok hyaluronanu o koncentraci 1 g/l má v porovnání s ultra čistou deionizovanou vodou znatelně vyšší hodnoty hustoty, tudíž lze předpokládat, že smícháním roztoku kolagenu s roztokem hyaluronanu se dosáhne vyšších hodnot hustoty. V *Grafu 7* je rozdíl hustot roztoku kolagenu a roztoku kolagenu s hyaluronannem mezi nejnižší koncentrací (0 g/l kol) 0,000478 g/cm³ a mezi nejvyšší koncentrací (30 g/l kol) 0,000366 g/cm³. Při 25°C má roztok kolagenu s hyaluronanem o nejnižší koncentraci kolagenu o 0,37 m/s vyšší ultrazvukovou rychlost než roztok kolagenu bez hyaluronanu o téže koncentraci. Pro stejnou teplotu se rovná rozdíl ultrazvukových rychlostí nejvyšší koncentrace roztoků kolagenu a kolagenu s hyaluronanem 0,31 m/s.

3.6.2 Měření ultrazvukové rychlosti roztoků kolagenu a roztoků kolagenu s hyaluronanem ultrazvukovým spektrometrem s vysokým rozlišením (HRUS)

Pomocí ultrazvukového spektrometru s vysokým rozlišením byly naměřeny hodnoty relativních ultrazvukových rychlostí. Relativní ultrazvuková rychlost představuje rozdíl mezi rychlostí zvuku vzorku a srovnávací rychlostí zvuku. Veškerá data, uvedená v grafech, se týkají pouze jedné ze sedmi frekvencí, jelikož bylo zjištěno, že výsledky měření nejsou závislé na frekvenci. Byla vybrána frekvence 8099 kHz, pro niž platí číslo piků 65. Všechny výsledné hodnoty ultrazvukových rychlostí byly získány jako průměr desíti ustálených hodnot během 45 minutového měření každého vzorku.

3.6.2.1 Roztoky kolagenu v ultra čisté deionizované vodě

Všechny vzorky roztoku kolagenu pro jednotlivé koncentrace od 0-30 g/l byly měřeny minimálně dvakrát.

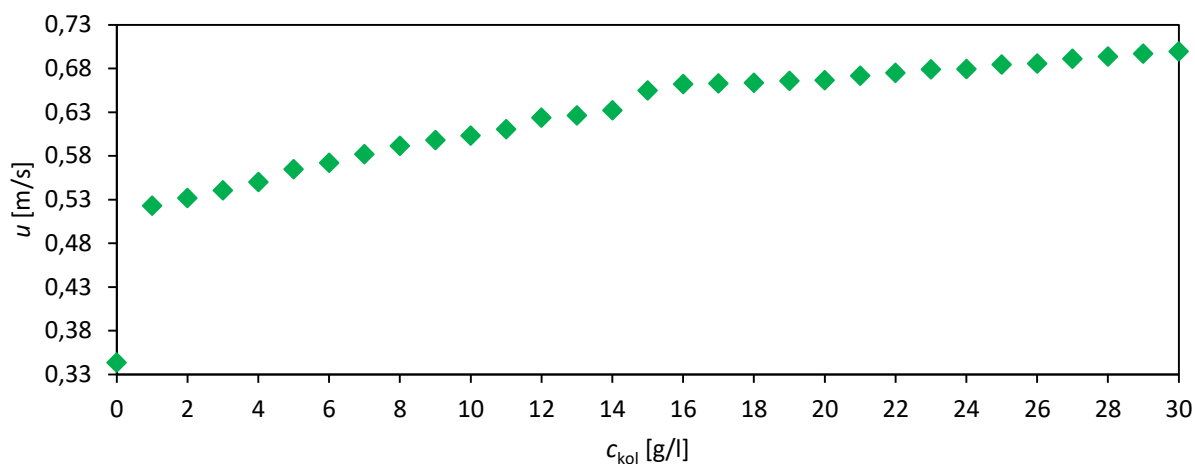


Graf 8: Závislost relativní ultrazvukové rychlosti na koncentraci 0-30 g/l roztoků kolagenu ve vodě při 25°C.

Graf 9 ukazuje závislost relativní ultrazvukové rychlosti na koncentraci od 0 do 30 g/l s krokem 1 g/l roztoků kolagenu v ultra čisté deionizované vodě z přístroje PURELAB při stálé teplotě 25°C, kdy lze vidět, že s rostoucí koncentrací se téměř lineárně zvyšují hodnoty ultrazvukové rychlosti. Větší odstup nastává u koncentrací od 24 g/l do 30 g/l patrně kvůli gelovitější povaze daných roztoků. Nejnižší relativní hodnota ultrazvukové rychlosti, jež přísluší ultra čisté deionizované vodě, se rovná 0,004279 m/s a nejvyšší relativní hodnota pro roztok kolagenu o koncentraci 30 g/l je 0,545903 m/s.

3.6.2.2 Roztoky kolagenu s hyaluronanem v ultra čisté deionizované vodě

Veškeré vzorky pro jednotlivé koncentrace 0-30 g/l kolagenu s hyaluronanem o stálé koncentraci 1 g/l byly měřeny minimálně dvakrát a za stejných podmínek jako vzorky kolagenu v ultra čisté deionizované vodě. Výsledné hodnoty ultrazvukových rychlostí byly zaznamenány graficky.



Graf 9: Závislost relativní ultrazvukové rychlosti na koncentraci 0-30 g/l roztoků kolagenu s hyaluronanem ve vodě při 25°C.

Závislost relativní ultrazvukové rychlosti na koncentraci 0-30 g/l roztoků kolagenu s hyaluronanem v ultra čisté deionizované vodě s krokem 1 g/l při 25°C je zaznamenána v Grafu 10, kde s rostoucí koncentrací vzorků narůstají hodnoty ultrazvukové rychlosti téměř lineárně. Největší skok lze vidět mezi roztoky 0 g/l a 1 g/l pravděpodobně díky značnému zvýšení hustoty po přidání kolagenu. Od koncentrace 1 g/l do koncentrace 14 g/l je prudší nárůst mezi jednotlivými koncentracemi, než mezi koncentracemi 15-30 g/l. Nejnížší relativní ultrazvuková rychlost, jež připadá vzorku 0 g/l kolagenu, má hodnotu 0,343515 m/s a nejvyšší relativní rychlost, náležící roztoku 30 g/l kolagenu s hyaluronanem, se rovná 0,699339 m/s.

4 Závěr

Cílem této práce bylo seznámit se s využitím densitometrie a ultrazvukové spektrometrie s vysokým rozlišením pro charakterizaci biochemických materiálů v chemii. Teoretická část poskytuje informace o kolagenu a kyselině hyaluronové. Obě látky se díky svým vlastnostem dají využít hlavně v medicínských a kosmetických produktech. Jedním z přípravků lze zmínit kolagenový gel. Dále jsou zde popsány metody měření. Na základě doporučení a získaných informací o používaných látkách byly sestaveny dvě koncentrační řady roztoků kolagenu. V prvním případě byly připraveny roztoky kolagenu v ultra čisté deionizované vodě. Za druhé byly přichystány roztoky kolagenu s hyaluronanem v ultra čisté deionizované vodě. V experimentální části byly u obou koncentračních řad roztoků kolagenu pomocí densitometrie měřeny hustota a ultrazvuková rychlost. Dále byla měřena relativní ultrazvuková rychlost metodou ultrazvukové spektrometrie s vysokým rozlišením (HRUS).

Hustota a ultrazvuková rychlost naměřené densitometricky byly zaznamenány pro teploty 20-50°C po 5°C. Pro obě koncentrační řady platí, že s rostoucí teplotou hustota klesá, naproti tomu ultrazvuková rychlost s nárůstem teploty stoupá.

Pro koncentrační řadu kolagenu rozpuštěného v ultra čisté deionizované vodě byla závislost hustoty na rostoucí koncentraci téměř lineární. Ultrazvuková rychlost dané koncentrační řady vykazuje větší odchýlení od linearit při popisu závislosti na rostoucí koncentraci roztoků kolagenu, nicméně i zde platí, že s narůstající koncentrací roztoků kolagenu se zvyšuje ultrazvuková rychlost.

U koncentrační řady kolagenu s hyaluronanem v ultra čisté deionizované vodě bylo opět naměřeno, že s rostoucí koncentrací roztoků se jejich hustota zvyšuje téměř lineárně. Totéž platí i pro ultrazvukovou rychlost.

Dále byly porovnány obě koncentrační řady roztoků, kdy celkově hodnoty hustot a ultrazvukových rychlostí řady kolagenu s hyaluronanem byly vyšší než hodnoty řady roztoků kolagenu v ultra čisté deionizované vodě. Příčinu nejspíše představuje zvýšená hustota již samotného roztoku hyaluronanu oproti ultra čisté deionizované vodě.

Druhou používanou metodou byla ultrazvuková spektrometrie s vysokým rozlišením (HRUS), díky níž byla měřena relativní ultrazvuková rychlost obou koncentračních řad roztoků při teplotě 25°C. Pro obě řady bylo dosaženo podobných závislostí relativní ultrazvukové rychlosti na rostoucí koncentraci roztoků.

Pro koncentrační řadu kolagenu v ultra čisté deionizované vodě platí, že od koncentrace 24 g/l dochází k většímu rozestupu relativní ultrazvukové rychlosti mezi jednotlivými koncentracemi roztoků, což je zřejmě způsobeno gelovitější povahou roztoků.

Velmi podobnou závislost relativní ultrazvukové rychlosti lze sledovat i pro roztoky kolagenu s hyaluronanem v ultra čisté deionizované vodě. Nicméně zde platí, že nárůst relativní ultrazvukové rychlosti dochází do koncentrace 14 g/l kolagenu. Od této zmíněné koncentrace roztoků po koncentraci roztoků 30 g/l nedochází k velkým odchylkám v nárůstu ultrazvukové rychlosti, pravděpodobně díky tomu, že gelovitost mezi jednotlivými koncentracemi se už tolik neodlišuje.

Při porovnání relativních ultrazvukových rychlostí obou koncentračních řad lze vyzorovat, že roztoky kolagenu s hyaluronanem mají výsledné hodnoty v porovnání s roztoky kolagenu vyšší.

Výsledky naměřené v této práci lze uplatnit v medicínských aplikacích pro přípravu kolagenového gelu, kde by mohla být vhodná koncentrace 14 g/l kolagenu s hyaluronanem 1 g/l, který může být použit pro lepší hojení kůže.

Obsahem této práce byla charakterizace roztoků kolagenu a roztoků kolagenu s hyaluronanem z hlediska popisu chování hustot a ultrazvukových rychlostí na zvyšující se koncentraci daných roztoků. Dalším bodem experimentální části by byla příprava kolagenového gelu s obsahem hyaluronanu a studium jeho charakteristik pomocí reologie.

5 Použitá literatura

- [1] DI LULLO, G. A., S. M. SWEENEY, J. KORKKO, L. ALA-KOKKO a J. D. SAN ANTONIO. Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2002, roč. 277, č. 6 [cit. 2016-03-21], 4223-4231. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M110709200>
- [2] McINTOSH, J. What is collagen? What does collagen do?. In: *Medical News Today*. [online]. 2015 [cit. 2016-03-25]. Dostupné z: <http://www.medicalnewstoday.com/articles/262881.php>
- [3] SIKORSKI, Z. E. *Chemical and Functional Properties of Food Proteins*. Boca Raton: CRC Press. 2001. ISBN 1-56676-960-4.
- [4] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [5] CLARK, G., PARKER, E., SCHAAD, J. A W. J. WARREN. New measurements of previously unknown large interplanar spacings in natural materials. *J. Amer. Chem. Soc.* [online]. 1935, roč. 57, č. 8, 2002 [cit. 2016-03-22], 1509. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01311a504>
- [6] SZPAK, P. Fish bone chemistry and ultrastructure: implications for taphonomy and stable isotope analysis. *Journal of Archaeological Science* [online]. 2011, roč. 38, č. 12 [cit. 2016-03-22], 3358-3372. ISSN 03054403. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jas.2011.07.022>
- [7] PETERKOVÁ, P. a L. LAPČÍK. Kolagen - vlastnosti, modifikace a aplikace. *Chem. Listy*. 2000, roč. 94, č. 6, 371 - 379. ISSN 0009-2770
- [8] KHOSHNOODI, J., J.-P. CARTAILLER, K. ALVARES, A. VEIS a B. G. HUDSON. Molecular Recognition in the Assembly of Collagens: Terminal Noncollagenous Domains Are Key Recognition Modules in the Formation of Triple Helical Protomers, *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2006, roč. 281, č. 50 [cit. 2016-03-22], 38117-38121. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/281/50/38117.full>
- [9] DIEGELMANN, R. Collagen Metabolism In: *Medscape* [online]. 2014 [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://www.medscape.com/viewarticle/423231>
- [10] SHUSTER, S.. Osteoporosis, a unitary hypothesis of collagen loss in skin and bone: implications for taphonomy and stable isotope analysis. *Medical Hypotheses* [online]. 2005, roč. 65, č. 3 [cit. 2016-03-22], 426-432. ISSN 03069877. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306987705002148>

- [11] BIRBRAIR, A., T. ZHANG, D. FILES, et al. Type-1 pericytes accumulate after tissue injury and produce collagen in an organ-dependent manner. *Stem Cell Research and Therapy* [online]. 2014, roč. 5, č. 6 [cit. 2016-03-22], 122. ISSN 1757-6512. Dostupné z: <http://stemcellres.com/content/5/6/122>
- [12] OLIVEIRA, S. M., R. A. RINGSHIA, R. Z. LEGEROS, E. CLARK, M. J. YOST, L. TERRACIO a C. C. TEIXEIRA. An improved collagen scaffold for skeletal regeneration: implications for taphonomy and stable isotope analysis. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2009, roč. 94, č. 2 [cit. 2016-03-22], 371-379 ISSN 15493296. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.a.32694/abstract;jsessionid=FD15C8D1D9F16D2B35FAB0FC9A530E11.f03t02>
- [13] SINGH, O., S. GUPTA, M. SONI, et al. Collagen dressing versus conventional dressings in burn and chronic wounds: A retrospective study. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* [online]. 2011, roč. 4, č. 1 [cit. 2016-03-22], 12-16. ISSN 0974-2077. Dostupné z: <http://www.jcasonline.com/text.asp?2011/4/1/12/79180>
- [14] NECAS, J; BARTOSIKOVA, L; BRAUNER, P, et al. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina*. 2008, roč. 53, č. 8, 397–411. ISSN 0375-8427
- [15] MAIVALDOVÁ Iva. *Kyselina hyaluronová a možnosti jejího využití*. Brno, 2008. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [16] SAARI, Herkko, Yrj T. KONTTINEN, Claes FRIMAN a Timo SORSA. Differential effects of reactive oxygen species on native synovial fluid and purified human umbilical cord hyaluronate. *Inflammation* [online]. 1993, roč. 17, č. 4 [cit. 2016-03-23], 403-415. ISSN 0360-3997. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00916581>
- [17] SCHULZ, T., U. SCHUMACHER a P. PREHM. Hyaluronan Export by the ABC Transporter MRP5 and Its Modulation by Intracellular cGMP. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2007, roč. 282, č. 29 [cit. 2016-03-23], 20999-21004. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M700915200>
- [18] YOSHIHARA, S., A. KON, D. KUDO, H. NAKAZAWA, I. KAKIZAKI, M. SASAKI, M. ENDO a K. TAKAGAKI. A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits liver metastasis of melanoma cells. *FEBS Letters* [online]. 2005, roč. 579, č. 12, [cit. 2016-03-23], 2722-2726. ISSN 00145793. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.febslet.2005.03.079/full>

- [19]TESAR, B. M., D. JIANG, J. LIANG, S. M. PALMER, P. W. NOBLE a D. R. GOLDSTEIN. The Role of Hyaluronan Degradation Products as Innate Alloimmune Agonists. *American Journal of Transplantation* [online]. 2006, roč. 6, č. 11 [cit. 2016-03-23], 2622-2635. ISSN 1600-6135. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-6143.2006.01537.x/full>
- [20]STECCO C, STERN R, PORZIONATO A, MACCHI V, MASIERO S, STECCO A a R. DE CARO. Hyaluronan within fascia in the etiology of myofascial pain. *Surg Radiol Anat* [online]. 2011, roč. 33, č. 10 [cit. 2016-03-23], 891–896. ISSN: 1279-8517 Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/51688372_Hyaluronan_within_fascia_in_the_etiology_of_myofascial_pain
- [21]ABATE, M., V. SALINI. Hyaluronic Acid in the Treatment of Osteoarthritis. What is New, *Osteoarthritis - Diagnosis, Treatment and Surgery*. Italy: InTech. 2012. ISBN 978-953-51-0168-0
- [22]CHEN, W.Y.J.; ABATANGELO, G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound repair and regeneration* [online]. 1999, roč. 7, č. 2 [cit. 2016-03/23], 79-89. ISSN 1524-475X. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1524-475X.1999.00079.x/full>
- [23]SHIMIZU, Y. a Y. TAKIMOTO. *Collagen gel*. [patent] USA. Patent US6335007 B1. Přihlášeno 26. 5. 1998.
- [24]YUNOKI, Shunji a Nobuhiro NAGAI. *Collagen gel and process of producing the same*. [patent] USA. Patent US8105629 B2. Přihlášeno 24. 5. 2005.
- [25]CHAMIEH F, A-M Collignon, BR Coyac, et al. Accelerated craniofacial bone regeneration through dense collagen gel scaffolds seeded with dental pulp stem cells. In: *Scientific Reports* [online]. 2016 [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/srep38814>
- [26]KARGEROVÁ, A. Využití hustoměru nejen k měření hustoty. *CHEMPOINT* [online]. Brno: Vysoké učení technické, 2012 [cit. 2016-12-08]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/vyuziti-hustomeru-nejen-k-mereni-hustoty-1337185879>
- [27]KARGEROVÁ, A. a M. PEKAŘ. Densitometry and ultrasound velocimetry of hyaluronan solutions in water and in sodium chloride solution. *Carbohydrate Polymers* [online]. Brno, 2014, roč. 2014, č. 106 [cit. 2016-12-08], 453-459. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.020>
- [28]SKLENÁŘOVÁ, R. *Systém kolagen-hyaluronan v koloidním stříbře*. Brno, 2015. Bakalářská práce. Vysoké učení technické. Vedoucí práce Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.

- [29] POLEDŇÁKOVÁ, H. *Charakterizace karagenanu densitometrií*. Brno, 2015. Bakalářská práce. Vysoké učení technické. Vedoucí práce Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.
- [30] KARGEROVÁ, A. HRUS – Ultrazvuk s vysokým rozlišením na Fakultě chemické, VUT v Brně. *CHEMPOINT* [online]. Brno: Vysoké učení technické, 2012 [cit. 2016-12-08]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/hrus>
- [31] TRTEK, J. *Charakterizace pektinu ultrazvukovou spektroskopií*. Brno, 2016. Bakalářská práce. Vysoké učení technické. Vedoucí práce Ing. Andrea Kargerová, Ph.D.
- [32] Kolagen-pevnost-integrita-struktura. *Orling* [online]. 2015 [cit. 2016-12-08]. Dostupné z: <https://www.orling.cz/cs/clanky/prof-adam-a-kolagen/kolagen-a-pojivove-tkane/kolagen-pevnost-integrita-struktura.html>
- [33] Kolagén 4000: Ako to funguje. *Kolagenstada* [online]. 2015 [cit. 2016-12-08]. Dostupné z: <http://www.kolagenstada.sk/html/fungovanie.html>
- [34] Heteroglykosidy: Mukopolysacharidy: Kyselina hyaluronová. *ELUC* [online]. 2013 [cit. 2016-12-08]. Dostupné z: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/2480>

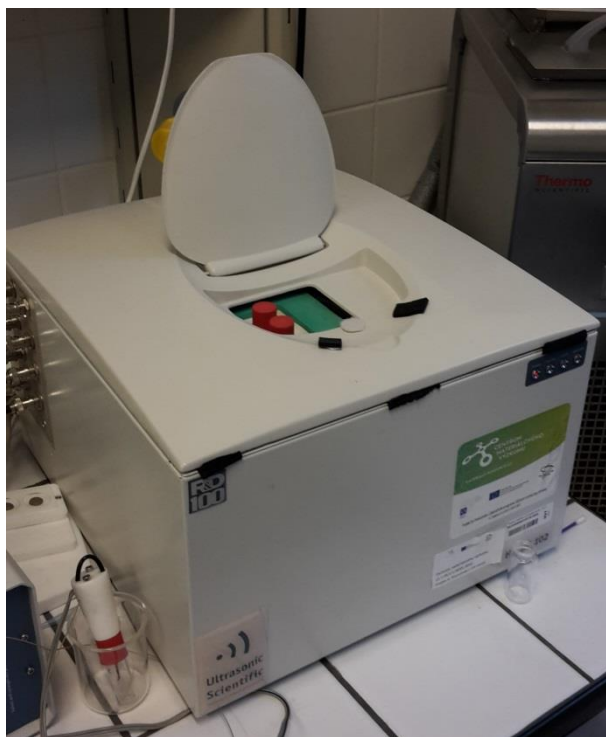
6 Seznam použitých symbolů a zkratek

ABC	ATP Binding Cassette, transportní protein
β	řecké písmeno beta
c	koncentrace
CD44	clusters of differentiation 44, specifický receptor
CoA	koenzym A
Da	dalton, jednotka molekulové hmotnosti
g/cm^3	gram na centimetr krychlový, jednotka hustoty
g/l	gram na litr, jednotka hmotnostní koncentrace
HRUS	high resolution ultrasonic spektroskopie, ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením
HYA	kyselina hyaluronová, hyaluronan
kg	kilogram, jednotka hmotnosti
kHz	kilohertz, jednotka frekvence
kol	kolagen
m/s	metr za sekundu, jednotka rychlosti
ml	mililitr, jednotka objemu
mm	milimetr, jednotka délky
mm^2	milimetr krychlový, jednotka plochy
nm	nanometr, jednotka délky
PBS	phosphate buffered saline, fosfátový pufr
RHAMM	receptor pro hyaluronan zprostředkovanou motilitu
rpm	otáčky za minutu, vedlejší jednotka frekvence
t	teplota
TLR	toll-like receptor
u	relativní ultrazvuková rychlost
UDP	uridindifosfát
μm	mikrometr, jednotka délky
v	ultrazvuková rychlost
%	procento
$^{\circ}\text{C}$	stupeň Celsia, vedlejší jednotka teploty
ρ	hustota
$\Delta\rho_{\text{směr.}}$	směrodatná odchylka hustoty
$\Delta v_{\text{směr.}}$	směrodatná odchylka ultrazvukové rychlosti
=	znaménko rovnosti

7 Přílohy



Obrázek X1: Hustoměr DSA 5000M od firmy Anton Paar



Obrázek X2: Ultrazvukový spektrometr s vysokým rozlišením (HR-US 102)

Tabulka XI: Hodnoty hustot kolagenu ve vodě pro 20-50°C.

c_{kol} [g/l]	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C
0	0,998203	0,997051	0,995657	0,994043	0,992227	0,990225	0,988043
1	0,998215	0,997064	0,995668	0,994056	0,992241	0,990236	0,988055
2	0,998236	0,997084	0,995692	0,994076	0,992259	0,990255	0,988074
3	0,998248	0,997097	0,995702	0,994088	0,992271	0,990268	0,988085
4	0,998252	0,997099	0,995704	0,994090	0,992275	0,990270	0,988090
5	0,998258	0,997106	0,995711	0,994097	0,992282	0,990279	0,988098
6	0,998275	0,997123	0,995730	0,994114	0,992298	0,990295	0,988114
7	0,998298	0,997145	0,995748	0,994136	0,992320	0,990317	0,988135
8	0,998297	0,997145	0,995750	0,994137	0,992320	0,990316	0,988135
9	0,998304	0,997151	0,995756	0,994144	0,992326	0,990323	0,988141
10	0,998314	0,997162	0,995766	0,994152	0,992337	0,990334	0,988152
11	0,998340	0,997187	0,995792	0,994179	0,992343	0,990337	0,988179
12	0,998341	0,997189	0,995793	0,994181	0,992343	0,990343	0,988180
13	0,998341	0,997190	0,995797	0,994185	0,992344	0,990357	0,988185
14	0,998349	0,997196	0,995800	0,994185	0,992353	0,990364	0,988186
15	0,998365	0,997213	0,995818	0,994204	0,992383	0,990386	0,988206
16	0,998368	0,997216	0,995819	0,994209	0,992392	0,990394	0,988213
17	0,998358	0,997217	0,995825	0,994208	0,992399	0,990408	0,988227
18	0,998372	0,997220	0,995826	0,994217	0,992405	0,990406	0,988230
19	0,998379	0,997229	0,995833	0,994218	0,992407	0,990411	0,988230
20	0,998384	0,997231	0,995835	0,994227	0,992393	0,990416	0,988235
21	0,998400	0,997246	0,995849	0,994236	0,992411	0,990425	0,988247
22	0,998412	0,997255	0,995856	0,994252	0,992423	0,990439	0,988247
23	0,998388	0,997259	0,995849	0,994269	0,992427	0,990437	0,988257
24	0,998418	0,997264	0,995865	0,994279	0,992430	0,990447	0,988274
25	0,998440	0,997287	0,995891	0,994295	0,992466	0,990486	0,988286
26	0,998468	0,997314	0,995918	0,994311	0,992495	0,990493	0,988307
27	0,998493	0,997342	0,995946	0,994333	0,992518	0,990513	0,988331
28	0,998506	0,997353	0,995958	0,994339	0,992526	0,990521	0,988340
29	0,998517	0,997364	0,995967	0,994352	0,992536	0,990532	0,988349
30	0,998536	0,997382	0,995987	0,994371	0,992553	0,990549	0,988367

Tabulka X2: Hodnoty ultrazvukových rychlostí kolagenu ve vodě pro 20-50°C.

c_{kol} [g/l]	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C
0	1482,64	1496,74	1509,11	1519,82	1528,94	1536,57	1542,80
1	1482,84	1496,78	1509,10	1519,79	1528,90	1536,53	1542,76
2	1482,78	1496,73	1509,06	1519,75	1528,87	1536,50	1542,73
3	1482,64	1496,67	1509,04	1519,74	1528,86	1536,51	1542,74
4	1482,78	1496,75	1509,10	1519,79	1528,91	1536,54	1542,77
5	1482,83	1496,77	1509,11	1519,80	1528,92	1536,55	1542,79
6	1482,77	1496,79	1509,14	1519,84	1528,96	1536,61	1542,84
7	1482,84	1496,82	1509,17	1519,86	1528,97	1536,60	1542,83
8	1482,95	1496,88	1509,20	1519,87	1528,98	1536,61	1542,83
9	1482,92	1496,87	1509,20	1519,88	1528,99	1536,61	1542,83
10	1482,96	1496,89	1509,22	1519,90	1529,01	1536,63	1542,85
11	1482,95	1496,83	1509,21	1519,90	1528,98	1536,60	1543,86
12	1482,93	1496,88	1509,21	1519,89	1529,00	1536,61	1542,88
13	1482,96	1496,87	1509,20	1519,89	1528,99	1536,62	1542,88
14	1482,96	1496,90	1509,22	1519,91	1529,02	1536,66	1542,89
15	1482,99	1496,93	1509,24	1519,91	1529,02	1536,64	1542,89
16	1483,00	1496,93	1509,26	1519,94	1529,06	1536,66	1542,95
17	1483,01	1496,99	1509,24	1519,94	1529,09	1536,65	1542,94
18	1482,96	1496,92	1509,25	1519,93	1529,03	1536,64	1542,93
19	1483,13	1497,00	1509,30	1519,99	1529,33	1536,75	1542,95
20	1483,04	1496,98	1509,30	1519,98	1529,10	1536,74	1542,96
21	1483,04	1496,99	1509,31	1519,99	1529,10	1536,72	1542,96
22	1483,06	1496,99	1509,32	1520,03	1529,11	1536,75	1542,98
23	1483,11	1497,05	1509,33	1520,05	1529,13	1536,78	1542,98
24	1483,07	1497,02	1509,35	1520,05	1529,14	1536,75	1542,99
25	1483,13	1497,07	1509,40	1520,14	1529,22	1536,85	1543,03
26	1483,19	1497,14	1509,46	1520,13	1529,25	1536,88	1543,09
27	1483,21	1497,15	1509,47	1520,14	1529,24	1536,86	1543,08
28	1483,41	1497,34	1509,67	1520,34	1529,45	1537,11	1543,34
29	1483,30	1497,22	1509,54	1520,20	1529,29	1536,91	1543,14
30	1483,30	1497,21	1509,52	1520,19	1529,28	1536,90	1543,15

Tabulka X3: Hodnoty hustot a ultrazvukových rychlostí hyaluronanu o koncentraci 1 g/l pro 20-50°C.

	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C
ρ [g/cm ³]	0,998684	0,997529	0,996131	0,994516	0,992699	0,990694	0,988513
v [m/s]	1483,14	1497,11	1509,48	1520,17	1529,29	1536,91	1543,16

Tabulka X4: Hodnoty hustot kolagenu s hyaluronanem ve vodě pro 20-50°C.

c_{kol} [g/l]	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C
0	0,998684	0,997529	0,996131	0,994516	0,992699	0,990694	0,988513
1	0,998696	0,997544	0,996154	0,994538	0,992722	0,990716	0,988532
2	0,998695	0,997541	0,996159	0,994544	0,992726	0,990721	0,988540
3	0,998713	0,997560	0,996163	0,994548	0,992730	0,990725	0,988543
4	0,998722	0,997570	0,996173	0,994557	0,992740	0,990735	0,988552
5	0,998732	0,997580	0,996183	0,994567	0,992749	0,990744	0,988562
6	0,998732	0,997580	0,996183	0,994568	0,992750	0,990745	0,988563
7	0,998743	0,997589	0,996193	0,994576	0,992758	0,990754	0,988571
8	0,998748	0,997594	0,996198	0,994583	0,992765	0,990761	0,988580
9	0,998751	0,997596	0,996199	0,994583	0,992766	0,990761	0,988581
10	0,998755	0,997607	0,996211	0,994595	0,992776	0,990771	0,988589
11	0,998757	0,997613	0,996216	0,994600	0,992780	0,990774	0,988596
12	0,998768	0,997614	0,996217	0,994601	0,992783	0,990777	0,988605
13	0,998768	0,997614	0,996217	0,994602	0,992783	0,990778	0,988605
14	0,998771	0,997617	0,996220	0,994604	0,992785	0,990779	0,988614
15	0,998792	0,997637	0,996240	0,994624	0,992807	0,990801	0,988621
16	0,998797	0,997639	0,996242	0,994625	0,992807	0,990802	0,988621
17	0,998799	0,997641	0,996244	0,994628	0,992810	0,990804	0,988622
18	0,998803	0,997643	0,996246	0,994630	0,992813	0,990806	0,988625
19	0,998804	0,997648	0,996251	0,994635	0,992816	0,990811	0,988628
20	0,998810	0,997654	0,996254	0,994636	0,992818	0,990811	0,988630
21	0,998812	0,997662	0,996256	0,994640	0,992822	0,990815	0,988636
22	0,998812	0,997667	0,996256	0,994644	0,992826	0,990820	0,988639
23	0,998814	0,997671	0,996265	0,994646	0,992826	0,990821	0,988640
24	0,998815	0,997675	0,996276	0,994647	0,992828	0,990822	0,988641
25	0,998828	0,997673	0,996276	0,994659	0,992840	0,990833	0,988652
26	0,998829	0,997676	0,996278	0,994667	0,992847	0,990842	0,988662
27	0,998835	0,997682	0,996284	0,994670	0,992853	0,990845	0,988666
28	0,998843	0,997688	0,996290	0,994673	0,992855	0,990849	0,988669
29	0,998876	0,997721	0,996324	0,994707	0,992889	0,990883	0,988706
30	0,998903	0,997748	0,996346	0,994727	0,992910	0,990903	0,988724

Tabulka X5: Hodnoty ultrazvukových rychlostí kolagenu s hyaluronanem ve vodě pro 20-50°C.

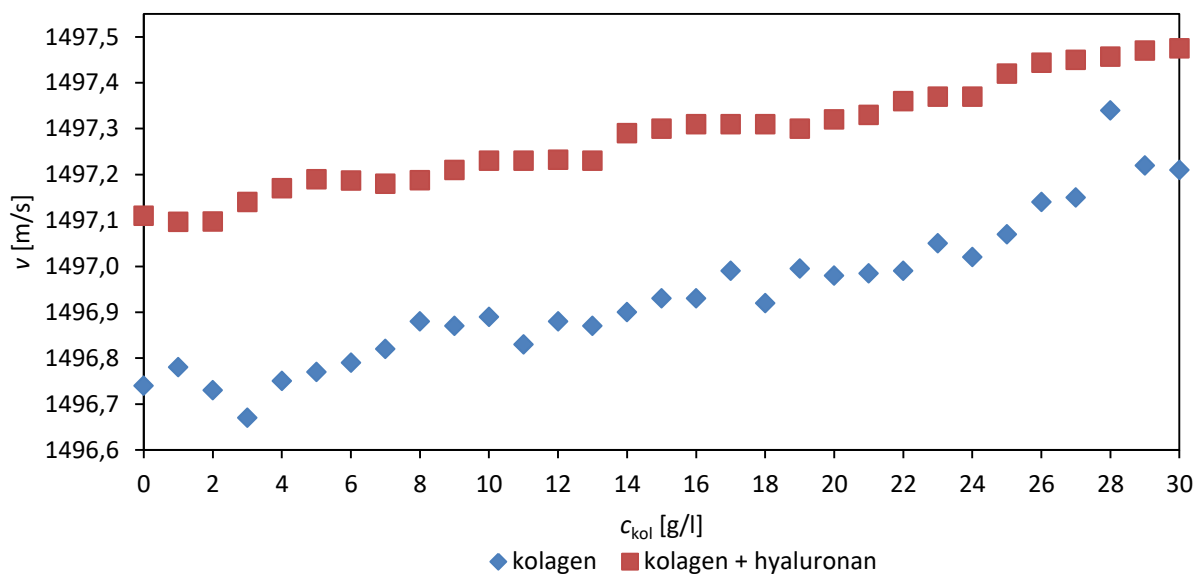
c_{kol} [g/l]	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C
0	1483,14	1497,11	1509,48	1520,17	1529,29	1536,91	1543,16
1	1483,08	1497,10	1509,41	1520,13	1529,22	1536,85	1543,08
2	1483,14	1497,10	1509,44	1520,13	1529,24	1536,87	1543,10
3	1483,17	1497,14	1509,48	1520,16	1529,27	1536,90	1543,13
4	1483,23	1497,17	1509,50	1520,18	1529,29	1536,91	1543,15
5	1483,25	1497,19	1509,51	1520,19	1529,30	1536,92	1543,15
6	1483,26	1497,19	1509,49	1520,18	1529,29	1536,92	1543,15
7	1483,25	1497,18	1509,50	1520,19	1529,30	1536,92	1543,14
8	1483,26	1497,19	1509,52	1124,49	1529,32	1536,92	1543,14
9	1483,29	1497,21	1509,53	1520,21	1529,32	1536,94	1543,15
10	1483,29	1497,23	1509,55	1520,22	1529,33	1536,94	1543,17
11	1483,30	1497,23	1509,56	1520,22	1529,33	1536,95	1543,17
12	1483,30	1497,23	1509,56	1520,22	1529,33	1536,95	1543,16
13	1483,32	1497,23	1509,55	1520,22	1529,33	1536,95	1543,17
14	1483,38	1497,29	1509,60	1520,28	1529,39	1537,01	1543,24
15	1483,37	1497,30	1509,61	1520,28	1529,42	1537,04	1543,27
16	1483,36	1497,31	1509,60	1520,28	1529,44	1537,05	1543,29
17	1483,36	1497,31	1509,63	1520,29	1529,42	1537,05	1543,29
18	1483,37	1497,31	1509,62	1520,31	1529,45	1537,08	1543,31
19	1483,37	1497,30	1509,62	1520,31	1529,43	1537,09	1543,29
20	1483,38	1497,32	1509,64	1520,32	1529,47	1537,13	1543,31
21	1483,41	1497,33	1509,66	1520,33	1529,49	1537,12	1543,30
22	1483,44	1497,36	1509,67	1520,35	1529,46	1537,08	1543,31
23	1483,45	1497,37	1509,69	1520,36	1529,51	1537,09	1543,33
24	1483,51	1497,37	1509,71	1520,38	1529,53	1537,12	1543,36
25	1483,51	1497,42	1509,74	1520,39	1529,57	1537,11	1543,34
26	1483,52	1497,44	1509,74	1520,41	1529,57	1537,16	1543,37
27	1483,53	1497,45	1509,75	1520,41	1529,57	1537,20	1543,41
28	1483,54	1497,46	1509,76	1520,42	1529,58	1537,22	1543,44
29	1483,56	1497,47	1509,77	1520,45	1529,59	1537,22	1543,44
30	1483,58	1497,48	1509,78	1520,44	1529,61	1537,22	1543,45

Tabulka X6: Hodnoty hustot a ultrazvukových rychlostí kolagenu ve vodě a kolagenu s hyaluronanem ve vodě pro 25°C.

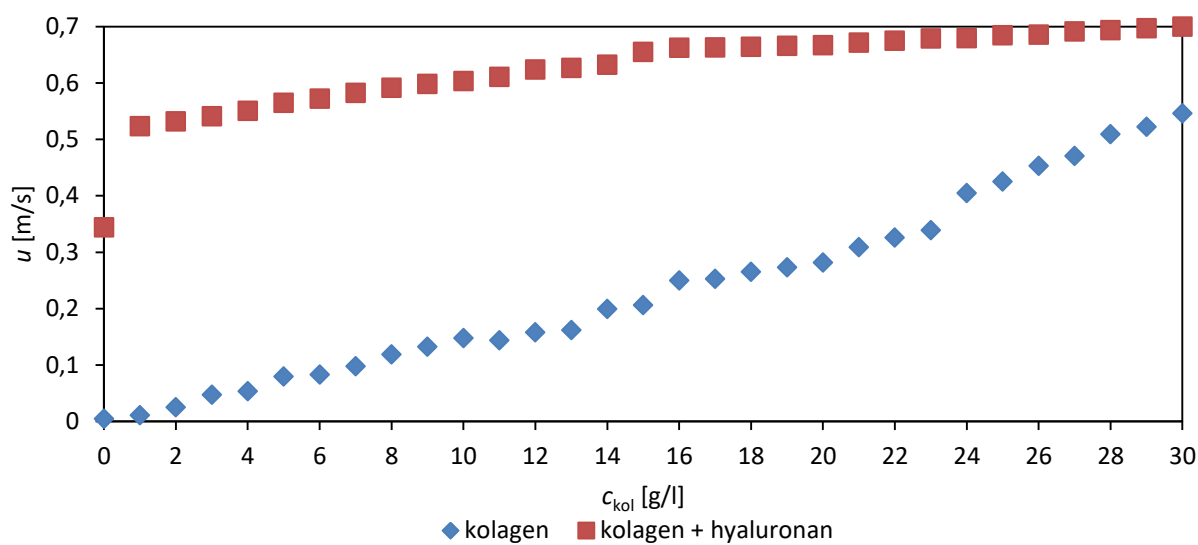
c_{kol} [g/l]	ρ_{kol} [g/cm ³]	$\rho_{\text{kol s HYA}}$ [g/cm ³]	v_{kol} [m/s]	$v_{\text{kol s HYA}}$ [m/s]
0	0,997051	0,997529	1496,74	1497,11
1	0,997064	0,997544	1496,78	1497,10
2	0,997084	0,997541	1496,73	1497,10
3	0,997097	0,997560	1496,67	1497,14
4	0,997099	0,997570	1496,75	1497,17
5	0,997106	0,997580	1496,77	1497,19
6	0,997123	0,997580	1496,79	1497,19
7	0,997145	0,997589	1496,82	1497,18
8	0,997145	0,997594	1496,88	1497,19
9	0,997151	0,997596	1496,87	1497,21
10	0,997162	0,997607	1496,89	1497,23
11	0,997187	0,997613	1496,83	1497,23
12	0,997189	0,997614	1496,88	1497,23
13	0,997190	0,997614	1496,87	1497,23
14	0,997196	0,997617	1496,90	1497,29
15	0,997213	0,997637	1496,93	1497,30
16	0,997216	0,997639	1496,93	1497,31
17	0,997217	0,997641	1496,99	1497,31
18	0,997220	0,997643	1496,92	1497,31
19	0,997229	0,997648	1497,00	1497,30
20	0,997231	0,997654	1496,98	1497,32
21	0,997246	0,997662	1496,99	1497,33
22	0,997255	0,997667	1496,99	1497,36
23	0,997259	0,997671	1497,05	1497,37
24	0,997264	0,997675	1497,02	1497,37
25	0,997287	0,997673	1497,07	1497,42
26	0,997314	0,997676	1497,14	1497,44
27	0,997342	0,997682	1497,15	1497,45
28	0,997353	0,997688	1497,34	1497,46
29	0,997364	0,997721	1497,22	1497,47
30	0,997382	0,997748	1497,21	1497,48

Tabulka X7: Hodnoty relativních ultrazvukových rychlostí kolagenu ve vodě a kolagenu s hyaluronanem ve vodě při 25°C.

c_{kol} [g/l]	u_{kol} [m/s]	$u_{\text{kol s HYA}}$ [m/s]
0	0,004279	0,343515
1	0,010820	0,522892
2	0,025014	0,531450
3	0,046855	0,540517
4	0,053212	0,550018
5	0,079210	0,564548
6	0,082996	0,571998
7	0,097695	0,581793
8	0,118442	0,591248
9	0,132159	0,597700
10	0,147528	0,603065
11	0,143259	0,610240
12	0,157529	0,623356
13	0,161326	0,625982
14	0,198917	0,631754
15	0,206043	0,654621
16	0,249679	0,661807
17	0,252196	0,662712
18	0,264945	0,663548
19	0,273026	0,665580
20	0,281114	0,666453
21	0,308445	0,671329
22	0,325699	0,674622
23	0,338706	0,678665
24	0,404421	0,679227
25	0,424650	0,684291
26	0,452690	0,685519
27	0,470311	0,690798
28	0,508760	0,693426
29	0,522043	0,696815
30	0,545904	0,699339



Graf X1: Závislost ultrazvukové rychlosti roztoků kolagenu ve vodě a roztoky kolagenu s hyaluronanem ve vodě o na rostoucí koncentraci kolagenu 0-30 g/l při 25°C.



Graf X2: Závislost relativní ultrazvukové rychlosti roztoků kolagenu ve vodě a roztoky kolagenu s hyaluronanem ve vodě na rostoucí koncentraci kolagenu 0-30 g/l při 25°C.